

AUS DER ABTEILUNG  
FÜR HÄMATOLOGIE UND INTERNISTISCHE ONKOLOGIE  
PROFESSOR DR. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# **EINFLUSS VON NICHT-STEROIDALEN ANTIRHEUMATIKA AUF DEN TUMORMETABOLISMUS**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Isabel Gedig

2017



AUS DER ABTEILUNG  
FÜR HÄMATOLOGIE UND INTERNISTISCHE ONKOLOGIE  
PROFESSOR DR. WOLFGANG HERR  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# **EINFLUSS VON NICHT-STEROIDALEN ANTIRHEUMATIKA AUF DEN TUMORMETABOLISMUS**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Isabel Gedig

2017

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Marina Kreutz

2. Berichterstatter:

PD Dr. Richard Bauer

Tag der mündlichen Prüfung:

27. Oktober 2017

# Inhaltsangabe

Inhaltsangabe.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Maligne Tumore und ihre Entstehung.....	1
1.1.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen für die Gesellschaft .....	1
1.1.2 Karzinogenese - vom Normalgewebe zum bösartigen Tumor .....	1
1.2 Veränderter Metabolismus von Tumorzellen .....	3
1.2.1 Molekulare Alterationen des Glukose-Stoffwechsels im Tumor .....	5
1.2.1.1 Bedeutung des alterierten Glukosestoffwechsels für:.....	8
1.2.1.1.1 Diagnostik und Prognose .....	8
1.2.1.1.2 Therapie.....	11
1.3 Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR).....	14
1.3.1 Definition und Indikation .....	14
1.3.2 Das Enzym Cyclooxygenase.....	14
1.3.2.1 COX-1 <i>versus</i> COX-2 .....	14
1.3.2.2 Unterschiedliche COX-Expression in Normal- und Tumorgewebe .....	16
1.3.3 NSAR als Anti-Krebs-Therapie.....	16
1.3.3.1 COX-abhängige vs. COX-unabhängige Effekte auf Tumorzellen .....	18
2 Zielsetzung.....	20
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Material .....	21
3.1.1 Geräte .....	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	22
3.1.3 Chemikalien, Kits und Reagenzien.....	22
3.1.4 RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen .....	23
3.1.5 Tumorzelllinien .....	24
3.1.6 Software.....	24
3.2 Methoden .....	25
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	25
3.2.1.1 Kultur und Passage von Tumorzelllinien .....	25

---

3.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität von Zelllinien .....	25
3.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Tumorzelllinien.....	26
3.2.1.4	Mykoplasmentest.....	27
3.2.1.5	<sup>3</sup> H-Thymidin Assay (Proliferationstest).....	27
3.2.1.6	O <sub>2</sub> -Kinetik mit dem SDR SensorDish®-Reader .....	27
3.2.1.7	Laktatmessung in Zellkulturüberständen.....	28
3.2.1.8	Glukosemessung in Zellkulturüberständen .....	29
3.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	30
3.2.2.1	RNA-Isolierung aus Tumorzellen .....	30
3.2.2.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	31
3.2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
3.2.2.3.1	Primerdesign.....	32
3.2.2.3.2	Real-time quantitative PCR (RT-qPCR).....	32
3.3	Statistik .....	34
4	Ergebnisse .....	35
4.1	Einfluss von NSAR auf das Proliferationsverhalten von Tumorzelllinien .....	35
4.1.1	Die Melanom-Zelllinie MelIM .....	35
4.1.2	Das NSAR Diclofenac als beispielhafte Substanz .....	38
4.1.3	COX-Selektivität als potentielle Ursache des proliferationshemmenden Effektes der NSAR - NS-398 als selektiver COX-2-Inhibitor .....	39
4.2	Modulation des Glukose-Stoffwechsels durch NSAR .....	40
4.2.1	Beeinflussung der Laktatproduktion von MelIM-Zellen durch Zugabe von unselektiven NSAR .....	40
4.2.2	Beeinflussung der Laktatproduktion verschiedener Tumorzelllinien durch Diclofenac .....	42
4.2.3	Beeinflussung des Glukose-Uptakes von MelIM-Zellen durch Zugabe von NSAR.....	43
4.3	Pharmakologische Modulation des Glukose-Stoffwechsels auf molekularer Ebene.....	46
4.3.1	Analyse des Einflusses von NSAR auf wichtige an der Glykolyse beteiligte Transporter und Enzyme.....	46
4.4	Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs humaner Tumorzelllinien nach Inkubation mit dem NSAR Diclofenac.....	51
5	Diskussion.....	54
5.1	NSAR als mögliche Inhibitoren des Tumorwachstums.....	54
5.1.1	Inhibition der Proliferation von malignen Melanom-Zellen durch Zugabe verschiedener NSAR <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	55

---

5.1.2	Ausschluss eines tumorzellspezifischen Effekts der NSAR - Vergleich verschiedener Tumorentitäten.....	56
5.1.3	Selektive COX-2-Inhibition - höhere Wirksamkeit in der Proliferationshemmung verschiedener Tumorzelllinien?.....	57
5.2	Der alterierte Glukosemetabolismus als potentiell therapeutisches <i>Target</i> für NSAR am Beispiel von malignen Melanom-Zellen.....	59
5.2.1	GLUT1 .....	59
5.2.2	LDHA .....	60
5.2.3	LDHB .....	62
5.2.4	MCT1 .....	63
5.2.5	HIF-1alpha .....	64
5.3	Untersuchung der Atmungsaktivität verschiedener Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zugabe von NSAR.....	65
5.4	Ausblick.....	66
6	Zusammenfassung.....	68
7	Literaturverzeichnis .....	69
	Danksagung .....	

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Mehrschritt-Modell - vom Normal- zum Tumorgewebe am Beispiel des Kolonkarzinoms .....	2
Abbildung 1-2	Glukosemetabolismus - Gegenüberstellung von „normaler“ Zelle und Tumorzelle.....	4
Abbildung 1-3	Umgebungsbedingungen im Tumormilieu.....	5
Abbildung 1-4	HIF-1 .....	6
Abbildung 1-5	Regulation des Glukosemetabolismus von Tumorzellen - die Rolle von MYC und HIF-1.....	8
Abbildung 1-6	Einfluss von Tumor-generiertem Laktat auf dessen Umgebung.....	10
Abbildung 1-7	Schlüsselfunktion des Laktats im Tumor.....	11
Abbildung 1-8	Schematischer Ausschnitt aus bereits existierenden Angriffspunkten im Metabolismus von Tumorzellen .....	13
Abbildung 1-9	Übersicht über die pharmakologische Klasse der COX-Inhibitoren .....	15
Abbildung 3-1	Neubauer Zählkammer .....	26
Abbildung 3-2	PreSens-Technologie .....	28
Abbildung 4-1	Bestimmung der Proliferationsrate von humanen Melanom-Zellen nach Behandlung mit den NSAR Diclofenac und Diflunisal .....	36
Abbildung 4-2	Bestimmung der Proliferationsrate von humanen Melanom-Zellen nach Behandlung mit den NSAR Ibuprofen und ASS .....	37
Abbildung 4-3	Bestimmung der Proliferationsrate von verschiedenen humanen Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem NSAR Diclofenac .....	38
Abbildung 4-4	Bestimmung der Proliferationsrate von verschiedenen humanen Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 .....	39
Abbildung 4-5	Inhibition der Laktat-Sekretion durch die NSAR Ibuprofen und ASS in humanen MelIM-Zellen .....	41
Abbildung 4-6	Inhibition der Laktat-Sekretion durch die NSAR Diclofenac und Diflunisal in humanen MelIM-Zellen .....	42
Abbildung 4-7	Inhibition der Laktat-Sekretion durch Diclofenac in verschiedenen humanen Tumorzellen .....	43
Abbildung 4-8	Beeinflussung des Glukose-Uptakes durch die NSAR Ibuprofen und ASS in humanen MelIM-Zellen .....	44
Abbildung 4-9	Beeinflussung des Glukose-Uptakes durch die NSAR Diclofenac und Diflunisal in humanen MelIM-Zellen .....	45



Abbildung 4-10 mRNA-Expression des Glukose-Transporters GLUT1 in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR.....	47
Abbildung 4-11 mRNA-Expression der Laktatdehydrogenase A in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR.....	48
Abbildung 4-12 mRNA-Expression des Laktat-Transporters MCT1 in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR.....	49
Abbildung 4-13 mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1alpha in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR.....	50
Abbildung 4-14 Sauerstoffverbrauch während der Kultur der humanen Tumorzelllinie MelIM nach Inkubation mit Diclofenac.....	52
Abbildung 4-15 Sauerstoffverbrauch während der Kultur der humanen Tumorzelllinie U937 nach Inkubation mit Diclofenac.....	52
Abbildung 4-16 Sauerstoffverbrauch während der Kultur der humanen Tumorzelllinie PC3 nach Inkubation mit Diclofenac .....	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1	Geräte .....	22
Tabelle 3-2	Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 3-3	Chemikalien und Reagenzien .....	23
Tabelle 3-4	Primer .....	24
Tabelle 3-5	Zelllinien .....	24
Tabelle 3-6	Software .....	24
Tabelle 3-7	Ablauf RT-qPCR .....	33

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>engl.</i> bovine serum albumine)
CA	Karzinom ( <i>engl.</i> carcinoma)
CD	Differenzierungs-Cluster ( <i>engl.</i> cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA ( <i>engl.</i> copy-DNA)
Ci	Curie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
Cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>engl.</i> counts per minute)
DC	dendritische Zelle ( <i>engl.</i> dendritic cell)
DG	Deoxyglukose
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere ( <i>lat.</i> et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	fetales Kälberserum ( <i>engl.</i> fetal calf serum)

---

FDA	Behörde für Lebens- und Arzneimittel ( <i>engl.</i> Food and Drug Administration)
$^{18}\text{F}$ FDG-PET	$^{18}\text{F}$ -Fluoro-2-Deoxy-D-Glukose- Positronen-Emissions-Tomographie
GLUT	Glukose-Transporter
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
$^3\text{H}$	Tritium
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
$\text{H}_2\text{O}_{\text{BIDEST}}$	zweifach destilliertes Wasser
$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$	zweifach destilliertes Wasser, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztes Wasser
$\text{H}_2\text{O}_{\text{USB}}$	DEPC-behandeltes USB-Wasser
HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor ( <i>engl.</i> hypoxia-inducible factor)
HK	Hexokinase
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom ( <i>engl.</i> hereditary non- polyposis colorectal cancer)
kD	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar (mol/l)
mM	millimolar (mmol/l)
MCT	Monocarboxylattransporter
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mRNA	Boten-RNA ( <i>engl.</i> messenger-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
$\text{O}_2$	Sauerstoff

---

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
RCC	Nierenzellkarzinom ( <i>engl.</i> renal cell carcinoma)
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>engl.</i> ribonucleic acid)
RPMI	<i>engl.</i> Roswell Park Memorial Institute (Entwicklungsort des Kulturmediums)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RT-qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit ( <i>engl.</i> Real-time quantitative polymerase chain reaction)
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes ( <i>engl.</i> standard error of the mean)
siRNA	<i>engl.</i> small interfering RNA
Tab.	Tabelle
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ( <i>engl.</i> temperature of melting)
TOOS	N-Ethyl-N-(2hydroxy-3-sulfopropyl) m- toluidin
UV	Ultraviolett
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)
vHL	Von Hippel-Lindau

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Tumore und ihre Entstehung

### 1.1.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen für die Gesellschaft

Maligne Neoplasien, im alltäglichen Sprachgebrauch als „Krebs“ bezeichnet, stellen sowohl weltweit<sup>[1]</sup> als auch in der Bundesrepublik Deutschland<sup>[2]</sup> die zweithäufigste Todesursache dar. Jährlich erkranken allein hierzulande circa 500 000 Menschen an Krebs, jeder vierte Mann und jede fünfte Frau verstirbt an einem Krebsleiden. Es finden sich geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Tumorentitäten: so ist bei den weiblichen Patienten der Brustkrebs für die höchste Mortalität verantwortlich, während Männer vor allem an Lungenkrebs versterben<sup>[3]</sup>. Obwohl die Forschung sich bereits seit vielen Jahren intensiv mit der Entwicklung von Therapiestrategien befasst, ist in einer immer älter werdenden Bevölkerung nach wie vor großer Bedarf an neuen, spezifischeren Ansätzen zur Bekämpfung von Krebs.

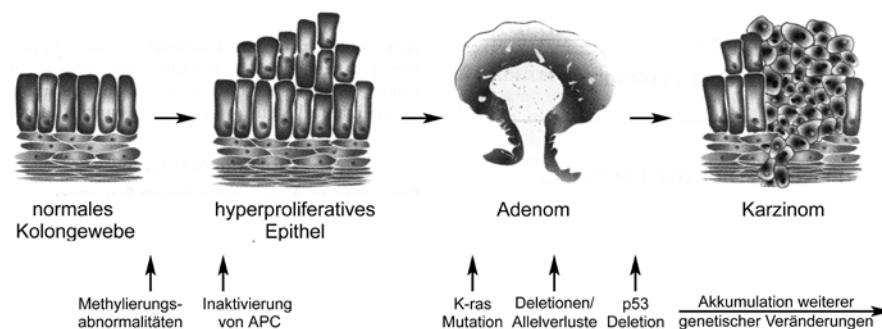
### 1.1.2 Karzinogenese - vom Normalgewebe zum bösartigen Tumor

Für die maligne Transformation einer normalen Körperzelle werden unterschiedliche Faktoren und Mechanismen verantwortlich gemacht: man geht davon aus, dass eine Vielzahl im Laufe des Lebens akquirierter somatischer Mutationen sowie bereits vorbestehende Veränderungen in der Keimbahn die Tumorentstehung begünstigen. Die Veränderungen des Erbgutes führen dann mit einer gewissen Latenz zu einem unkontrollierten Zellwachstum<sup>[4]</sup>.

Als mutagene Faktoren wurden unter anderem die Exposition gegenüber Strahlen oder Chemikalien, die Infektion mit bestimmten onkogenen Viren und chronische Entzündungszustände identifiziert<sup>[4, 5]</sup>.

Auf molekularer Ebene greifen viele an der Entartung einer Zelle beteiligte Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene an Schlüsselstellen in die Wachstumsregulation der Zelle ein oder sind an essentiellen Schritten des Metabolismus beteiligt<sup>[4, 5]</sup>. Bereits die Mutation eines von zwei Allelen in einem Proto-Onkogen sorgt für eine Aktivierung seines Onkogens. Im Gegensatz dazu ist die Mutation in beiden Allelen eines Tumorsuppressorgens, welches normalerweise der Entstehung einer malignen Neoplasie entgegenwirkt, für dessen Funktionsverlust notwendig.

Als „Musterbeispiel“ für oben beschriebenen Entartungsprozess vom Normal- zum Tumorgewebe wird häufig die Transformation der Dickdarmschleimhaut zum Kolon-Karzinom beschrieben<sup>[6]</sup>. In diesem Mehrschritt-Modell führen somatische Mutationen in bestimmten Schlüsselgenen zur Entwicklung von der normalen Zelle über das Adenom zum Adenokarzinom. Zu diesen Genen zählen unter anderem die Tumorsuppressorgene APC (*adenomatous polyposis coli*) und p53 sowie das Onkogen K-ras.



**Abbildung 1-1 Mehrschritt-Modell - vom Normal- zum Tumorgewebe am Beispiel des Kolonkarzinoms**

Abbildung modifiziert nach <sup>[7]</sup>.

Ähnliche Mechanismen finden sich auch in anderen Tumorentitäten. So spielt eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 ebenso eine wichtige Rolle in der Entstehung von Brust- und Lungenkrebs<sup>[8, 9]</sup>. Auch K-ras-Mutationen werden neben dem Darmkrebs in unterschiedlichen Krebsformen, wie dem Pankreas-Karzinom und dem Lungenkrebs, beobachtet<sup>[10]</sup>.

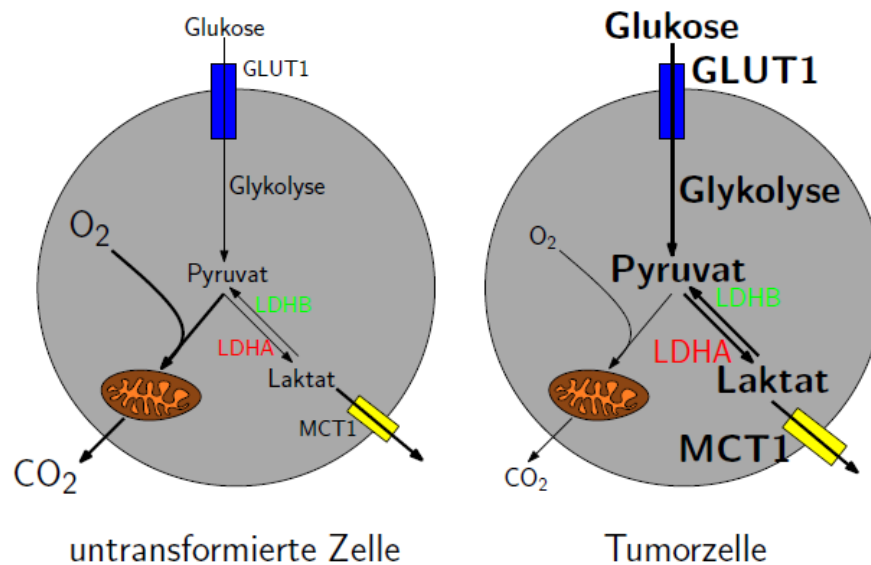
## 1.2 Veränderter Metabolismus von Tumorzellen

Tumorzellen weisen im Vergleich zu normalen Körperzellen multiple charakteristische Veränderungen in ihrem Wachstumsverhalten und ihrem Metabolismus auf. Dies scheint nach Darwins Prinzip „*survival of the fittest*“<sup>[11]</sup> einen Überlebensvorteil und ein aggressives Ausbreiten im menschlichen Körper zu ermöglichen.

Bereits vor ca. 80 Jahren beobachtete der deutsche Forscher Otto Heinrich Warburg, dass Tumorzellen einen gesteigerten Glukoseverbrauch aufweisen und hohe Mengen an Laktat ausschleusen<sup>[12]</sup>. Da Tumorzellen ihren Energiebedarf, im Gegensatz zu normalen Körperzellen, auch unter suffizienter Sauerstoffzufuhr hauptsächlich über die Umwandlung von Glukose via Pyruvat zu Laktat decken<sup>[13]</sup>, wird dies als sogenannte „aerobe Glykolyse“ bezeichnet. Auch wenn es sich hierbei um eine energetisch ineffektive Methode handelt (Generierung von lediglich 2 ATP im Gegensatz zu 36 ATP via oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien<sup>[5, 11, 14]</sup>), scheint die wesentlich schnellere Energiegewinnung diesen Nachteil auszugleichen sowie die Bereitstellung von „Baustoffen“ für die Zellteilung zu gewährleisten<sup>[15]</sup>. Dieses Phänomen der „aeroben Glykolyse“ ist ebenfalls weitläufig unter der sogenannten „Warburg-Hypothese“ oder dem „Warburg-Effekt“ - im Gegensatz zum „Pasteur-Effekt“<sup>[11, 16, 17]</sup> - bekannt.

Warburg postulierte eine gestörte mitochondriale Funktion als Ursache des beschriebenen Mechanismus in Krebszellen<sup>[12]</sup>. So beschreiben auch Pelicano et al. eine hohe Rate von Mutationen im Bereich der mitochondrialen DNA in vielen Tumoren, z.B. im Prostata- und Mamma-Karzinom. Vermutlich sind diese Tumorzellen deshalb zur Bereitstellung einer adäquaten ATP-Menge auf eine gesteigerte glykolytische Aktivität angewiesen<sup>[18]</sup>.



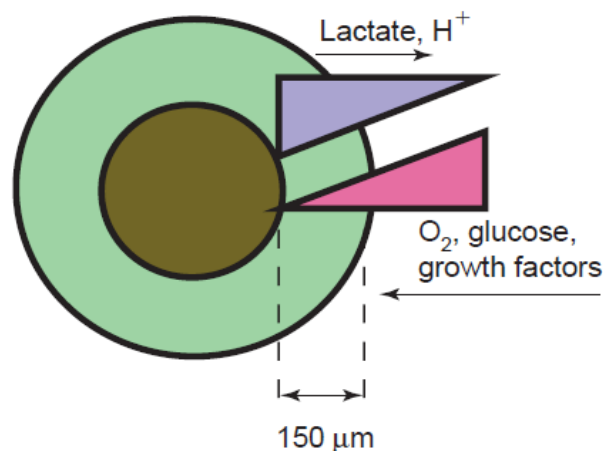


**Abbildung 1-2 Glukosemetabolismus - Gegenüberstellung von „normaler“ Zelle und Tumorzelle**  
 Schematisch dargestellt ist der Weg der Glukose durch eine untransformierte Körperzelle im Gegensatz zu einer Tumorzelle. Die Glukose wird normalerweise über GLUT1 in die Zelle geschleust, das in der Glykolyse entstandene Pyruvat wird anschließend in der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung verstoffwechselt. Im Rahmen der aeroben Glykolyse von Tumorzellen hingegen wird das Pyruvat durch die LDHA zu Laktat umgewandelt und über MCT1 aus der Zelle geschleust (modifiziert nach <sup>[19]</sup>).

Warburgs Hypothese und seine ursächliche Annahme einer gestörten Mitochondrienfunktion wird bis heute kontrovers diskutiert, es finden sich zahlreiche Publikationen, die dies bestätigen bzw. widerlegen<sup>[4, 11, 17, 18, 20, 21]</sup>. Allerdings konnte Warburgs Beobachtung verifiziert werden, dass insbesondere der Glukose-Stoffwechsel, in Kombination mit vielen weiteren alterierten Zellvorgängen (z.B. Glutaminolyse<sup>[22]</sup>), eine essentielle Bedeutung für die Karzinogenese zu haben scheint<sup>[11]</sup>.

### 1.2.1 Molekulare Alterationen des Glukose-Stoffwechsels im Tumor

Tumore sind als rasch proliferierende Gewebe auf eine kontinuierliche und suffiziente Nährstoffzufuhr angewiesen. Wie bereits erwähnt wurde in multiplen Studien ein gesteigerter Glukoseverbrauch von malignen Zellen beobachtet. Aufgrund ihres Proliferationsverhaltens müssen sich Tumore auch an widrige Umgebungsbedingungen anpassen. So findet sich in Abhängigkeit vom Abstand der Blutversorgung ein Gradient von Nährstoffen, Metaboliten und Sauerstoff.



#### Abbildung 1-3 Umgebungsbedingungen im Tumormilieu

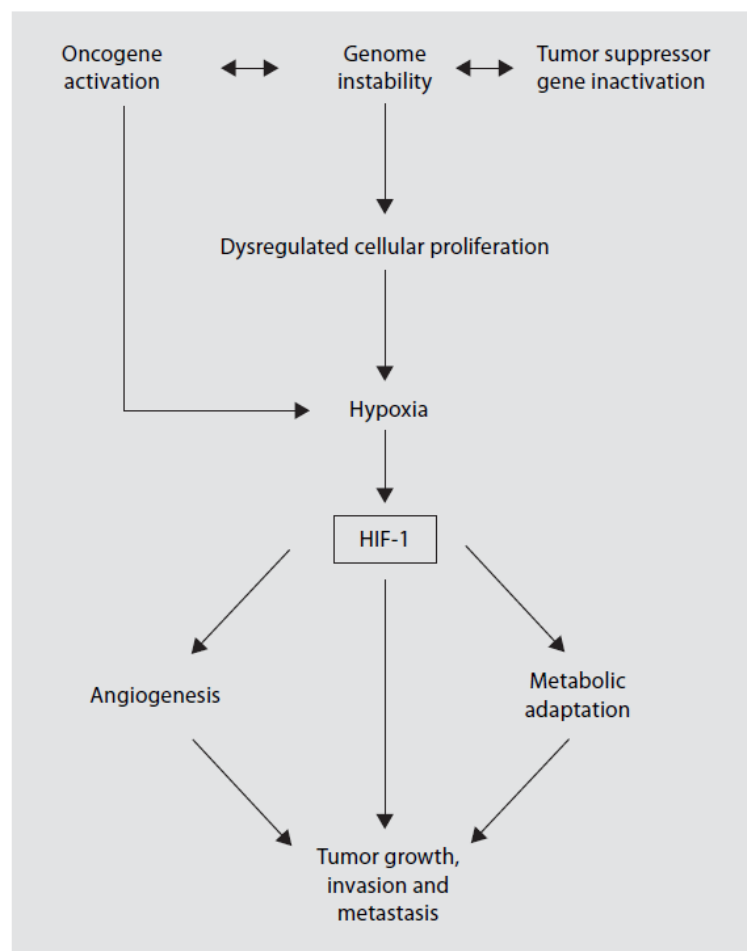
Abhängig vom Gradient der Metaboliten (z.B. Laktat, Glukose,  $O_2$ , etc.) finden sich lebende Zellen (grün) und ein nekrotisches Zentrum mit abgestorbenen Zellen (oliv). Je weiter eine Tumorzelle von ihrer Gefäßversorgung entfernt ist, desto mehr muss sie sich an widrige Umgebungsbedingungen adaptieren (modifiziert nach [22]).

Die Adaptation an ein hypoxisches Umgebungsmilieu stellt einen entscheidenden Schritt in der Tumorentwicklung dar<sup>[18, 22]</sup>. Eine zentrale Rolle hierbei scheint der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) zu spielen. Dieser aus zwei Untereinheiten (HIF-1alpha und HIF-1beta) bestehende Transkriptionsfaktor wird durch Hypoxie stabilisiert und bindet als Komplex an ein sogenanntes HRE (*hypoxia responsive element*), welches in vielen Promotor-Regionen von Hypoxie-regulierten Genen, u.a. im Bereich des Glukosestoffwechsels, lokalisiert ist<sup>[4]</sup>. So wird beispielsweise die gesteigerte Glukoseaufnahme vieler Tumorzellen durch die HIF-induzierte erhöhte Expression von membranständigen Glukosetransportern (GLUT1) reguliert. Dies wurde in vielen Tumorentitäten, u.a. im kolorektalen Karzinom, Mamma-, Blasen-, Ovarial- und Zervixkarzinom sowie Glioblastom, beschrieben und scheint mit einer schlechteren Überlebensrate und aggressiverem Tumorverhalten

assoziiert zu sein<sup>[4]</sup>. Zudem zeigt sich eine Hochregulation der glykolytischen ATP-Gewinnung auch über eine Überexpression glykolytischer Enzyme, wie z.B. der Laktatdehydrogenase A (LDHA), was mit einer gesteigerten Laktatproduktion des Tumors einhergeht<sup>[4, 13, 18, 22, 23]</sup>.

Darüber hinaus bewirkt HIF-1 eine vermehrte Tumor-assoziierte Neoangiogenese über eine Aktivierung des *vascular endothelial growth factors* (VEGF)<sup>[24]</sup>. Dies fördert wiederum Tumorwachstum und -aggressivität sowie Invasion und Metastasierung<sup>[4, 22, 25]</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 durch den Tumorsuppressor *von Hippel Lindau* (vHL) degradiert. Im klarzelligen Nierenzellkarzinom findet sich eine Mutation beider Allele des vHL, was zu einer konstitutiven Hochregulierung von HIF und somit zu einer dysbalancierten Transkriptionsaktivität der glykolytischen Enzyme und Transporter führt <sup>[4, 17, 26]</sup>.

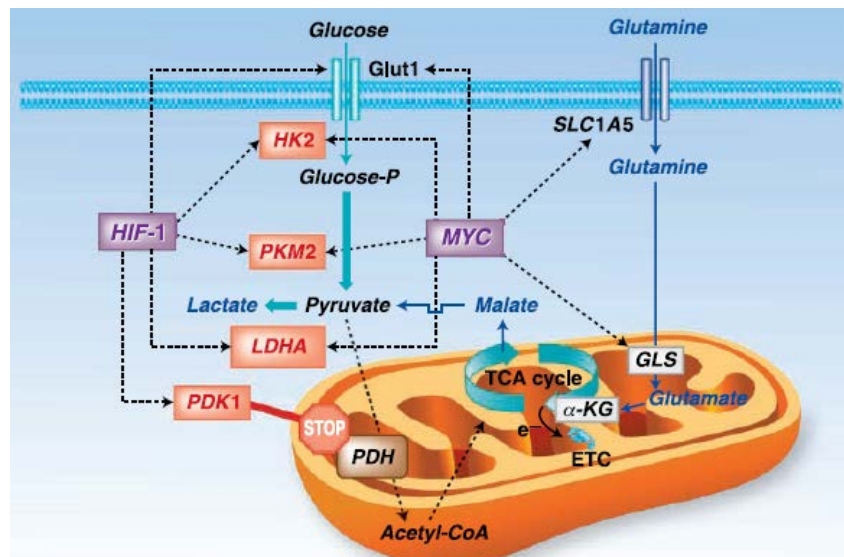


#### Abbildung 1-4 HIF-1

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist von zentraler Bedeutung für Tumorzellen im Hinblick auf Neoangiogenese sowie Förderung von Tumorwachstum und -ausbreitung (modifiziert nach<sup>[4]</sup>).

Zusätzlich haben Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen einen direkten Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Tumorzellen. Matoba et al. konnten zeigen, dass der Verlust des Tumorsuppressorgens p53 eine Hochregulation der Glykolyse über eine vermehrte Expression des Enzyms Hexokinase II bewirkt<sup>[27]</sup>. Eine Mutation der Onkogene K-ras und BRAF, wie sie unter anderem im Kolon- und Pankreaskarzinom sowie im malignen Melanom zu finden sind, bewirkt über eine Hochregulation der GLUT1-Expression eine erhöhte Glukoseaufnahme in die Tumorzellen<sup>[10, 14, 18]</sup>.

Das Onkogen MYC, welches auch in unserer Arbeitsgruppe untersucht wird und für den Transkriptionsfaktor c-myc kodiert, ist unter physiologischen Umständen in den Zellzyklus sowie in die Bildung der Ribosomen und Mitochondrien involviert. Darüber hinaus findet sich aber in vielen menschlichen Tumoren, u.a. Mamma-, Prostata- und Kolonkarzinom, eine deregulierte c-myc-Expression, welche insbesondere im Bereich des Glukosestoffwechsels anzusiedeln ist<sup>[28]</sup>. Zu den *Targets* dieses Transkriptionsfaktors gehören einige Gene eben dieses Glukosemetabolismus, und so spielt c-myc außerdem durch eine Überexpression u.a. der LDHA sowie von GLUT1 eine zentrale Rolle in malignen Tumoren<sup>[4, 13, 17, 22, 28, 29]</sup>. C-myc exhibiert seine Wirkung normalerweise unter normoxischen Bedingungen und bedingt so möglicherweise eine Aufrechterhaltung der aeroben Glykolyse. Interessanterweise scheint c-myc im oben angesprochenen hypoxischen Tumormilieu in Hinblick auf die Regulation der glykolytischen Gene mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, nämlich dem bereits diskutierten HIF-1, zu kooperieren und hiermit die „normale“ mitochondriale Energiegewinnung weiter zu supprimieren<sup>[28]</sup>.



**Abbildung 1-5 Regulation des Glukosemetabolismus von Tumorzellen - die Rolle von MYC und HIF-1**

Die zwei für Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene beeinflussen essentielle Schritte der Glykolyse (Glukosetransporter GLUT1, Hexokinase 2, Laktatdehydrogenase A) und fördern so die aerobe Glykolyse und Laktatgenerierung von Tumorzellen. Ebenfalls abgebildet ist der Einfluss dieser Gene auf die Glutaminolyse, ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg in Tumoren (modifiziert nach<sup>[28]</sup>).

Alle diese Erkenntnisse stellen einen potentiellen Ansatz für prognostische und therapeutische Optionen dar und rücken den Glukosemetabolismus in das Interesse weiterführender onkologischer Forschung.

### 1.2.1.1 Bedeutung des alterierten Glukosestoffwechsels für:

#### 1.2.1.1.1 Diagnostik und Prognose

Wie bereits durch Warburg im letzten Jahrhundert beobachtet, weisen maligne Gewebe eine gesteigerte Glukose-Aufnahme und -Verstoffwechselung auf. Dies macht sich die heutige medizinische Diagnostik mittels der sogenannten FDG-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) zu Nutzen<sup>[4, 11, 16, 17, 30]</sup>. Diese nicht-invasive Untersuchungsmethode ermöglicht die Darstellung von glykolytisch hochaktivem Gewebe, und somit der Lokalisation und *Follow-up*-Kontrolle von Neoplasien und Fernmetastasen. Die Tumorzellen nehmen als Markersubstanz das nicht verstoffwechselbare Glukose-Analogon [<sup>18</sup>F]-Fluorodeoxy-Glukose (<sup>18</sup>FDG) auf und können so detektiert werden<sup>[4, 14, 31]</sup>. Es zeigte sich weiterhin, dass die FDG-Akkumulation in verschiedenen Tumorentitäten (Brust, Pankreas, Lunge) mit der

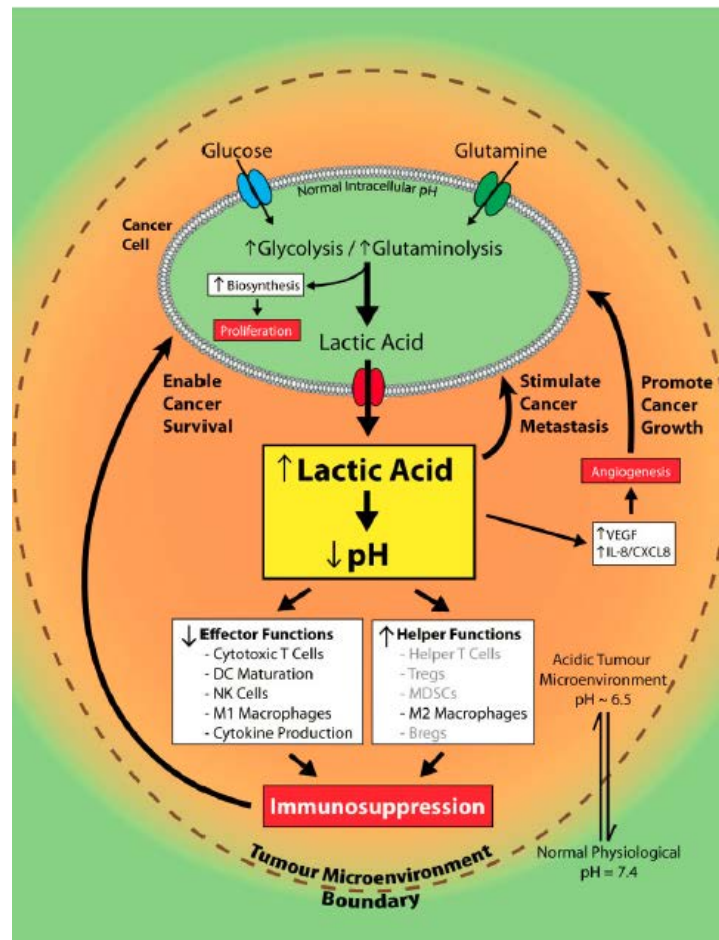
GLUT1-Expression in den Tumorzellen korreliert und dadurch einen gewissen Rückschluss auf die Aggressivität des Tumors erlaubt<sup>[4]</sup>.

Als logische Konsequenz der gesteigerten Glykolyse in Tumorzellen wird eine erhöhte Laktatproduktion bzw. -exkretion aus diesen Zellen beobachtet, was ebenfalls bereits von Warburg beschrieben wurde<sup>[12]</sup>. Die Höhe der extrazellulären Laktat-Konzentration korreliert mit dem Metastasierungspotenzial dieser Tumorzellen. Dies konnte unter anderem im Zervix-Karzinom und in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches sowie im Darmkrebs gezeigt werden<sup>[17, 32]</sup>.

Analog zur oben erwähnten PET-Diagnostik könnte also ein sogenanntes „*Laktat-Imaging*“ als frühzeitiger Indikator des malignen Potentials eines Tumors zur Therapieentscheidung und Prognoseabschätzung beitragen<sup>[30, 32]</sup>.

Eng mit diesen Erkenntnissen vergesellschaftet finden sich Überlegungen, auch das Laktat-generierende Enzym LDH als prognostischen „Bio-Marker“ zu etablieren<sup>[13, 23]</sup>. Dieses ist ebenfalls in vielen Tumorentitäten, unter anderem auch im Nierenzell- und Ösophaguskarzinom, hochreguliert und in der Regel mit einer schlechten Prognose assoziiert. Entsprechend zeigen Untersuchungen, dass ein Ausschalten eben dieses Enzyms die Tumorzellmigration sowie das Tumorwachstum inhibieren<sup>[13]</sup>.

Laktat begünstigt außerdem das sogenannte „*immune escape*“ von malignen Tumoren<sup>[14, 24]</sup>. Es reichert sich im Tumor-Milieu an und inhibiert die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (DC) sowie die Freisetzung von Zytokinen aus DCs und zytotoxischen T-Zellen<sup>[33-35]</sup>. Ein kritischer Faktor scheint hierbei die Ansäuerung der Tumorumgebung und eine pH-abhängige Suppression der Immunzellen zu sein<sup>[14]</sup>. Weiterhin stimuliert Laktat die tumorassoziierte Angiogenese<sup>[14, 30]</sup>. Entsprechend ließ sich in tumorassoziierten Makrophagen eine hohe Expression von VEGF nachweisen<sup>[24]</sup>.

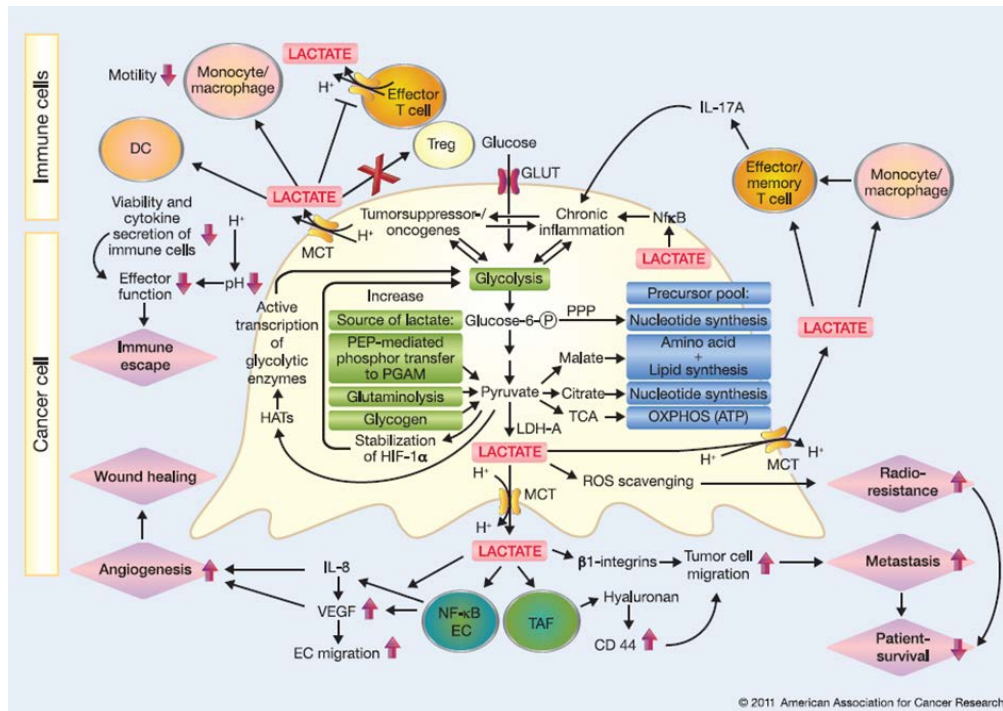


**Abbildung 1-6 Einfluss von Tumor-generiertem Laktat auf dessen Umgebung**

Die exzessive Laktatproduktion von Krebszellen und daraus resultierende Ansäuerung des Milieus verstärkt das Tumorwachstum sowie die Metastasierung, u.a. durch Stimulation der vascular endothelial growth factor (VEGF) Expression. Darüber hinaus hat die produzierte Milchsäure einen immun-supprimierenden Effekt und hemmt z.B. die Reifung von dendritischen Zellen bzw. die Funktion von zytotoxischen T-Zellen (modifiziert nach<sup>[14]</sup>).

In diesem Zusammenhang ließ sich, unter Einfluss von Laktat, eine erhöhte Zell-Migration, und somit ein gesteigertes Metastasierungspotenzial beobachten, was mit den oben erwähnten Ergebnissen von Walenta et al. korrespondiert. Darüber hinaus fand sich ein inverser Zusammenhang der Laktatkonzentration mit dem Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie sowie dem Überleben von Krebspatienten. Auch die Hypoxie im Tumormilieu scheint eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung zu begünstigen<sup>[18]</sup>.





**Abbildung 1-7 Schlüsselfunktion des Laktats im Tumor** (modifiziert nach<sup>[30]</sup>).

### 1.2.1.1.2 Therapie

Die Energiegewinnung aus Glukose via aerobe Glykolyse ist mit einer deutlich geringeren ATP-Ausbeute verbunden als der „normale“ Weg via mitochondriale oxidative Phosphorylierung. Aufgrund dessen ist es für die Tumorzellen essentiell, eine hohe glykolytische Aktivität aufrechtzuerhalten und macht diese Stoffwechselschritte zu einem therapeutisch interessanten Ziel<sup>[18]</sup>.

Das zuvor erwähnte Glukose-Analogon 2-Deoxy-Glukose kommt nicht nur im Rahmen der Diagnostik zum Einsatz, sondern zeigt auch einen potentiellen therapeutischen Nutzen als Glykolyse-Inhibitor<sup>[16, 18]</sup>. Dieser Effekt wurde bereits von Cay et al. beobachtet, welche Zellen eines Kolonkarzinoms in Rattenlebern injizierten und mit dem „Anti-Metabolit“ 2-DG behandelten<sup>[36]</sup>. Dies führte zu einer Reduktion des Tumorwachstums. Auch konnte durch Airley et al. ein besseres Ansprechen auf eine anschließend durchgeführte Radiotherapie gezeigt werden<sup>[4]</sup>. Bisher haben aber nur wenige Substanzen, z.B. Steroide (Dexamethason, Prednisolon) sowie Dichloracetat, als Glykolyseinhibitoren ihren Weg in den klinischen Einsatz gefunden<sup>[37]</sup>.

Im Normalgewebe sind die intakten Mitochondrien in der Lage, die Energiegewinnung der Zellen auf alternative Energiequellen, wie z.B. Glutamin, umzustellen, falls die



Glykolyse inhibiert wird. Dies könnte bedeuten, dass nicht-maligne transformierte Körperzellen im Gegensatz zu den Tumorzellen weniger empfindlich für die potentiell in der Krebstherapie eingesetzten Glykolyseinhibitoren sind<sup>[18]</sup> und somit weniger unerwünschte Wirkungen zu erwarten wären. Eine Kombination verschiedener therapeutischer Strategien (Radiatio, „klassische“ Chemotherapie, Glykolyseinhibitoren) erscheint sinnvoll, auch im Hinblick auf mögliche dosisabhängige unerwünschte Nebenwirkungen. So sind oft hohe Dosen der Glykolyseinhibitoren zum Erzielen des erwünschten Effekts notwendig. Diese Dosen sind aber zeitgleich mit einer Toxizität gegenüber Normalgewebe mit hohem Glukoseumsatz (Gehirn, Retina, Hoden) verbunden<sup>[16, 18]</sup>.

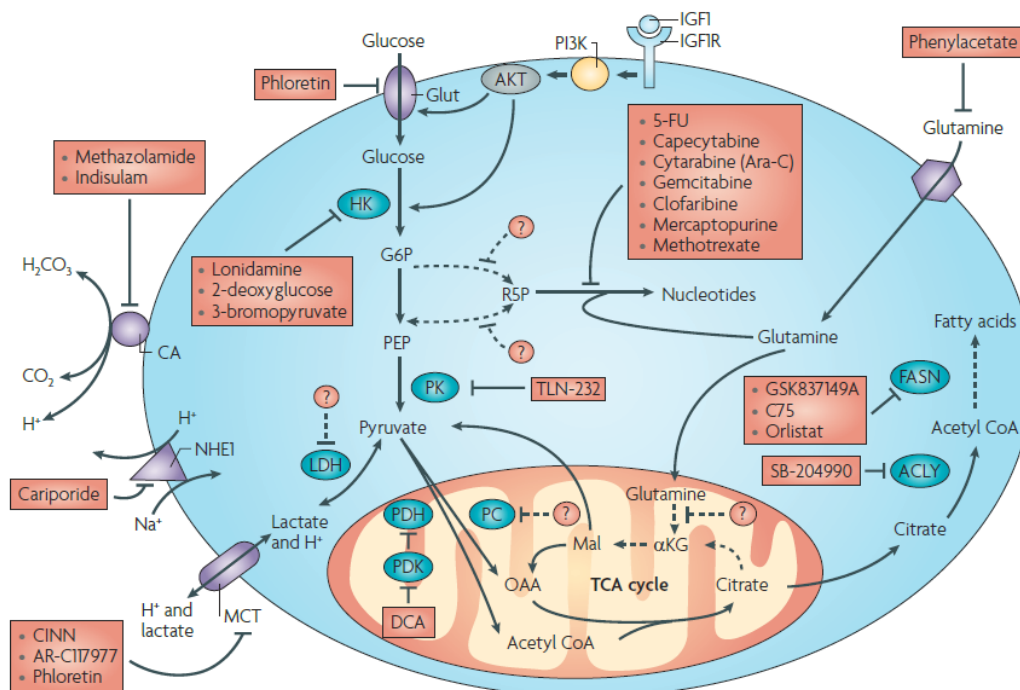
Im Hinblick auf den alterierten Glukosemetabolismus in Tumorzellen lag es nahe, Patienten mit einer Krebserkrankung (u.a. Brustkrebs) und zusätzlichem Diabetes mellitus Typ 2 zu untersuchen, welche unter Therapie mit dem weit verbreiteten oralen Antidiabetikum Metformin aus der Gruppe der Biguanide standen<sup>[16]</sup>. Die Ergebnisse ließen auf einen Überlebensvorteil von Patienten unter konsequenter Einnahme dieses Medikaments schließen. Auch Zhang et al. sahen ein reduziertes Risiko für Darmkrebs bei Diabetes-Patienten unter Metformin-Therapie<sup>[38]</sup>.

Ein noch potenteres Biguanid mit größerer zytotoxischer Wirkung auf Tumorzellen scheint das Phenformin zu sein. Dieses Medikament war aber in den 1970er Jahren aufgrund seines Nebenwirkungsprofils vom Markt genommen worden. Insbesondere kritisiert wurde das Auftreten von schwerer Laktatazidose, einer typischen unerwünschten Wirkung von Biguaniden. Nun konnte durch die Kombination des eben erwähnten oralen Antidiabetikums mit Oxamat, einem LDH-Inhibitor, durch eine reduzierte Laktatproduktion nicht nur diese Nebenwirkung reduziert werden. Zusätzlich zeigte sich auch eine synergistische und effektive anti-kanzerogene Wirkung durch diese Substanzkombination<sup>[39]</sup>.

Einhergehend mit diesen Beobachtungen postulierten Forscher als weitere Anti-Krebs-Strategie das konsequente Einhalten einer „*low-carbohydrate and high-fat*“-Diät. Sie mutmaßten, dass Tumorzellen, die auf Glukose als essentielle Energiequelle angewiesen sind, im Gegensatz zu normalen Körperzellen ihren Stoffwechsel nicht auf Ketonkörper adaptieren und so einen Überlebensnachteil aufweisen könnten<sup>[16]</sup>.

Ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt scheint weiterhin die gesteigerte Produktion von Laktat durch die Tumorzellen zu sein, welches offensichtlich nicht nur als „Abfallprodukt“ der Glykolyse zu sehen ist<sup>[14, 40]</sup>. Hierauf und auf die möglichen therapeutischen Ansatzpunkte auf genetischer Ebene soll später (siehe unten, 1.3.3.1) noch genauer eingegangen werden.

Das universelle Problem vieler bisher zum Einsatz kommender Krebstherapeutika ist bekanntermaßen die mangelnde Selektivität gegenüber dem maligne transformierten Gewebe und der damit einhergehenden Toxizität auf normale Zellen<sup>[5]</sup>. Daher ist die Forschung bereits seit langem auf die Entwicklung spezifischer, auf den jeweiligen Tumor „personalisierter“ Therapieansätze fokussiert<sup>[18]</sup>. Im Rahmen dieser Bemühungen rückten bereits im letzten Jahrhundert die in der Therapie von Schmerzen und Entzündungen angesiedelten nicht-steroidalen Antirheumatika in den Fokus und sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.



**Abbildung 1-8 Schematischer Ausschnitt aus bereits existierenden Angriffspunkten im Metabolismus von Tumorzellen**

Der Glukosemetabolismus von malignen Zellen bietet mannigfaltige Schnittstellen, die therapeutisch angreifbar sind. Auf Abb. 1-8 kommen klinisch etablierte Substanzen (durchgezogener Pfeil →) sowie potentielle Angriffspunkte, die zum Teil noch weiter zu erforschen wären (gestrichelter Pfeil, ---->) zur Darstellung (modifiziert nach<sup>[16]</sup>).

## 1.3 Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)

### 1.3.1 Definition und Indikation

Die Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) gehört zu den weltweit am häufigsten eingesetzten Medikamenten<sup>[41]</sup>. Diese werden typischerweise aufgrund ihrer analgetischen und anti-inflammatorischen Wirkweise<sup>[6, 42]</sup> zur Therapie von Schmerzen und chronischen Entzündungszuständen verwendet. Namentlich sind hier vor allem das vermutlich bekannteste NSAR, *Aspirin®* (Acetylsalicylsäure, ASS) sowie Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac und Diflunisal hervorzuheben.

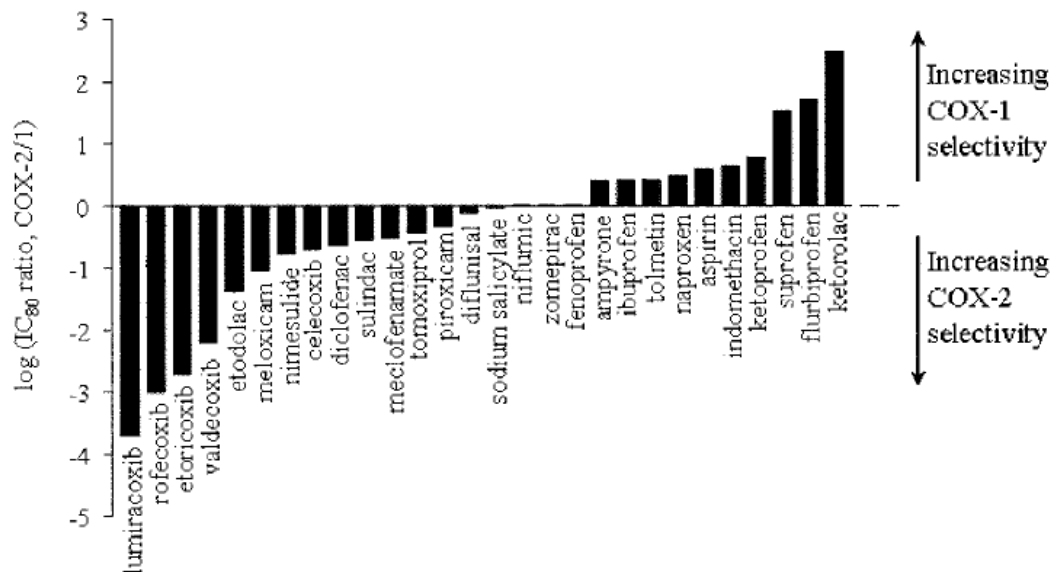
Diese Substanzen entfalten ihre pharmakologische Wirkung im Bereich des Lipidstoffwechsels und wirken insbesondere auf das Enzym Cyclooxygenase (COX). Dieses stellt in der Medizin seit über 3000 Jahren eines der häufigsten „*drug targets*“ dar<sup>[43]</sup>. Es katalysiert die Umsetzung von zuvor aus membranständigen Phospholipiden freigesetzter Arachidonsäure zu Thromboxan und Prostaglandinen<sup>[43]</sup>. Letztere, insbesondere Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), sind mitverantwortlich für die typischen Symptome einer Entzündung, nämlich *Rubor*, *Calor*, *Dolor*, *Tumor*<sup>[44]</sup> und *Functio laesa*<sup>[45]</sup> sowie für Schmerzempfinden und Fieber.

### 1.3.2 Das Enzym Cyclooxygenase

#### 1.3.2.1 COX-1 versus COX-2

Seit über 20 Jahren lässt eine profunde Datenlage auf die Existenz von zwei Isoformen der oben erwähnten Cyclooxygenase schließen<sup>[46, 47]</sup>. COX-1 wird konstitutiv im Gewebe exprimiert und sorgt für die physiologisch notwendige Prostaglandin-Produktion<sup>[46]</sup>. Hingegen handelt es sich bei der COX-2 um das induzierbare Isoenzym (u.a. durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Tumor-Promotoren<sup>[42]</sup>), welches unter anderem für die erhöhte Prostaglandin-Synthese im Entzündungs- und Tumorgewebe verantwortlich ist<sup>[42, 43, 46]</sup>.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Selektivität für diese Isoenzyme lassen sich die NSAR ebenfalls in verschiedene Gruppen unterteilen. So weisen Acetylsalicylsäure (ASS) und Ibuprofen eine höhere Affinität zur COX-1-Unterform auf, während Diclofenac und Diflunisal eine gewisse Tendenz zur vermehrten Inhibition der COX-2 zeigen<sup>[43]</sup>. Grundsätzlich zeichnen sich die hier erwähnten „traditionellen“ NSAR aber durch eine unselektive Wirkung auf beide Isoenzyme aus<sup>[48]</sup>.



**Abbildung 1-9 Übersicht über die pharmakologische Klasse der COX-Inhibitoren**

Dargestellt findet sich die relative Selektivität dieser Medikamente. Die Vertreter oberhalb der Null-Achse zeigen eine erhöhte COX-1-Selektivität, die darunter haben eine höhere Affinität zur COX-2 (modifiziert nach<sup>[43]</sup>).

Häufig beobachtete Nebenwirkungen im Einsatz der oben erwähnten „klassischen“ NSAR sind die gastrointestinale Toxizität sowie Blutungskomplikationen<sup>[46, 48, 49]</sup>. Da diese Vertreter der NSAR unselektiv wirken, aber teilweise eine höhere Wirksamkeit auf die COX-1-Isoform zu haben scheinen, postulierte man die Hemmung von eben diesem Isoenzym als Ursache der unerwünschten Wirkungen. Im Gegenzug wird die Inhibition von COX-2 als Ursache des NSAR-Effekts auf Tumorzellen vermutet<sup>[43, 46, 48]</sup>.

Hieraus resultierte das Bestreben zur Entwicklung von selektiven COX-2-Inhibitoren, von denen man sich eine Reduktion der gastrointestinalen Toxizität bei gleichbleibender anti-inflammatorischer und analgetischer Wirksamkeit erhoffte<sup>[46, 48]</sup>. Allerdings wurde bei diesen neueren Pharmaka in groß angelegten Studien (u.a. VIGOR und CLASS) ein vermehrtes Auftreten von thrombembolischen kardio- und zerebrovaskulären Ereignissen unter Einnahme von selektiven COX-2-Inhibitoren im Vergleich zu den „klassischen“ NSAR verzeichnet<sup>[41, 43, 46]</sup>. Deshalb musste Merck beispielsweise das Medikament Rofecoxib wieder vom Markt nehmen<sup>[46]</sup>.

### 1.3.2.2 Unterschiedliche COX-Expression in Normal- und Tumorgewebe

Es ist allgemein akzeptiert, dass chronische Entzündungszustände die Tumorentstehung begünstigen. So wurde in der Literatur die Aussage „*Tumore sind Wunden, die nicht heilen*“ geprägt<sup>[41]</sup>. Aufgrund dieser Beobachtungen liegt es nahe, dass auch pro-inflammatorische Stoffwechselwege und damit assoziierte Enzyme und Metabolite in Tumorzellen hochreguliert sind und somit das Tumorstadium begünstigen.

Die ersten Daten hierzu wurden in Bezug auf das kolorektale Karzinom publiziert. So beobachteten Eberhart et al. bereits 1994 erhöhte COX-2-Level in kolorektalen Tumoren<sup>[50]</sup>. Sowohl Prescott et al. als auch Cha et al. konnten dies bestätigen und zeigten darüber hinaus, dass sich hingegen keine Veränderung in Bezug auf die COX-1-Expression während der Tumorentstehung verzeichnen ließ<sup>[46, 51]</sup>. Bereits in gastrointestinalen Präkanzerosen, so auch im Barrett-Ösophagus, einer Vorstufe des Speiseröhrenkrebses, war COX-2 hochreguliert<sup>[52]</sup>. Die durch die Cyclooxygenase-2 produzierten Prostaglandine, insbesondere PGE<sub>2</sub>, scheinen offensichtlich einen regulierenden Einfluss auf die tumorassoziierte Angiogenese zu haben und das Immunsystem zu modulieren. Weiterhin beeinflussen sie die Zell-Migration und hemmen die Apoptose, was Tumorstadium, -aggressivität und Metastasierung zu fördern scheint<sup>[46, 48, 53-56]</sup>.

Eine Hochregulation der Cyclooxygenase-2 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen nicht nur in 85% der kolorektalen Adenokarzinome<sup>[55]</sup> beobachtet, sondern auch im Mamma-, Pankreas-, Magen-, Blasen-, Bronchial- und Prostata-Karzinom<sup>[46, 48, 54, 55, 57]</sup>. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass anti-inflammatorische Medikamente, wie die oben vorgestellten NSAR, einen potentiellen Ansatzpunkt im Rahmen der Tumorstadiumprävention und -therapie darstellen könnten.

### 1.3.3 NSAR als Anti-Krebs-Therapie

Bereits in den 1970er Jahren wurde in hochrangigen Journals wie dem *Lancet* ein möglicher Nutzen des Thrombozyten-Aggregationshemmers *Aspirin*® gegen Krebs erwähnt<sup>[58-60]</sup>.

Neuere Untersuchungen zeigen einen chemopräventiven Effekt von NSAR bei sporadischem und hereditärem Darmkrebs<sup>[42, 51]</sup>. Shiff et al. konnten eine NSAR-bedingte Reduktion der Mikrosatelliten-Instabilität in HNPCC-Zelllinien (*hereditary non polyposis colorectal cancer*) beobachten, denen es typischerweise an

funktionierenden *DNA-mismatch-repair*-Genen mangelt<sup>[6]</sup>. Noch eindrücklicher war der Effekt bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP), einer obligaten Präkanzerose. Die Autoren beobachteten eine Regredienz von bereits bestehenden polypoiden Adenomen unter NSAR-Therapie, was in randomisierten klinischen Studien durch den Einsatz des NSAR Sulindac und Celecoxib, einem selektiven COX-2-Inhibitor, bestätigt wurde<sup>[48]</sup>. Diese Ergebnisse veranlassten die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) zur Zulassung von Celecoxib in der adjuvanten Behandlung von familiärer adenomatöser Polyposis (FAP)-Patienten<sup>[55]</sup>. Auch im nicht-kleinzelligen Lungenkrebs konnte durch die Kombination von Celecoxib mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor die Überlebensrate gesteigert werden. Außerdem bewirkte Celecoxib ein verbessertes Ansprechen auf Bestrahlung und Chemotherapie<sup>[61]</sup>. Johnsen et al. zeigten wiederum eine *in vivo* Hemmung des Tumorstwachstums in Neuroblastom-Xenografts durch den Einsatz des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib<sup>[62]</sup>.

In aktuelleren Untersuchungen von Zelenay et al. kombinierten die Forscher in einem Melanom-Mausmodell eine anti-PD-1-Immuntherapie mit den NSAR Celecoxib bzw. Aspirin und erzielten so in dieser aggressiven Tumorentität via verstärkte Immunantwort eine Regression des Tumors<sup>[63]</sup>.

Der selektive COX-2-Inhibitor NS-398, der auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, scheint einen hemmenden Einfluss auf die Invasivität und Angiogenese von Tumorzellen zu haben<sup>[46]</sup>. Die Reversibilität des inhibitorischen Effekts durch Zugabe von Prostaglandinen lässt auf eine COX-Abhängigkeit des Phänomens schließen. Weitere Autoren konnten diesen Effekt von NS-398 bei der Untersuchung von COX-2-überexprimierenden Darm- und Prostatakrebszellen bestätigen<sup>[64, 65]</sup>.

Ein Review von Harris et al. dokumentierte eine signifikante exponentielle Abnahme des Risikos für gewisse Tumorentitäten durch die tägliche Einnahme von NSAR, insbesondere Acetylsalicylsäure und Ibuprofen<sup>[53]</sup>. So konnte eine Risikoreduktion von 63% im Kolon-CA, von 39% in Prostata- und Mamma-CA sowie bis zu 73% im Ösophagus-CA verzeichnet werden. Auch im malignen Melanom und Lymphom bzw. bei Leukämien zeigte sich eine protektive Wirkung. Diese Effekte traten erst nach einer längeren Einnahme von mindestens fünf bis zehn Jahren ein, je länger die Therapiedauer, desto grösser war der beobachtete Benefit. Die Bedeutung der kontinuierlichen Einnahme über viele Jahre wurde durch Elwood et al.<sup>[58]</sup> und Thun et

al.<sup>[48]</sup> bestätigt, über die genaue Dauer und Dosis sind sich die Autoren allerdings uneins und fordern die Durchführung weiterführender Studien.

Das Gros der initial publizierten Studien postuliert eine konzentrationsabhängige Inhibition der Cyclooxygenase, insbesondere der COX-2, durch NSAR - und somit einen anti-inflammatorischen Effekt - als Ursache der Wachstums hemmung und Induktion der Apoptose von malignen Zellen<sup>[66]</sup>. Allerdings gibt es auch verschiedene Hinweise, die auch COX-unabhängige Effekte als Ursache der anti-tumorösen Wirkung von NSAR als plausibel erscheinen lassen<sup>[6, 42, 46, 48]</sup>.

### 1.3.3.1 COX-abhängige vs. COX-unabhängige Effekte auf Tumorzellen

Grösch et al. konnten zeigen, dass der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib die Proliferationsrate von Kolonkarzinom-Zellen *in vitro* und *in vivo* reduziert, unabhängig davon, ob die Zellen COX-2 exprimierten. Darüber hinaus erzielte Celecoxib in einer anderen Darmkrebs-Zelllinie mit konstitutiver COX-2-Expression keine anti-proliferative Wirkung<sup>[67]</sup>.

Diese Ergebnisse decken sich mit bereits 1996 durch Hanif et al. durchgeführten Experimenten, in denen ebenso eine Prostaglandin-unabhängige, und somit auch COX-unabhängige Proliferationshemmung und Apoptose-Induktion in humanen Kolonkarzinom-Zellen gezeigt werden konnte<sup>[68]</sup>. Auch Thun et al. diskutieren, dass der selektive COX-2-Inhibitor NS-398 in einer humanen kolorektalen Tumorzelllinie Apoptose induziert, obwohl diese Zellen kein COX-2 exprimieren<sup>[48]</sup>.

Wie bereits eingangs erwähnt scheint nicht nur der Lipidstoffwechsel, sondern auch der Glukosemetabolismus von großer Bedeutung für Tumorzellen zu sein. Daher wurde in verschiedenen Ansätzen getestet, ob NSAR ihre antiproliferative Wirkung möglicherweise über diesen Stoffwechselweg entfalten. Auch die zentrale Rolle des bereits erörterten Transkriptionsfaktors HIF-1 wurde analysiert.

So konnten die NSAR Diclofenac und Ibuprofen in COX-2-exprimierenden und -defizienten Prostatakarzinomzellen die durch Hypoxie induzierte Hochregulation von HIF-1 reduzieren. Durch Ibuprofen war zusätzlich eine Suppression des HIF-abhängigen Glukosetransporters GLUT1 sowie des pro-angiogenetischen VEGF zu erzielen. Der selektive COX-2-Inhibitor NS-398 konnte weder HIF-1alpha noch VEGF oder GLUT1 beeinflussen, was auf einen COX-unabhängigen Effekt hindeutet<sup>[69]</sup>.

Im Gegensatz hierzu stehen die Experimente von Zhong et al., die durch Zugabe von NS-398 eine Inhibition von HIF-1alpha sowohl in COX-2-positiven als auch -negativen Zellen erzielten. Auch dies lässt allerdings eine COX-unabhängige Wirkung der NSAR vermuten<sup>[70]</sup>.

Ein weiterer wichtiger Faktor im Hinblick auf eine mögliche pharmakologische Beeinflussung des Glukosemetabolismus in Tumorzellen ist die verstärkte Laktatproduktion und die bereits initial erwähnte damit einhergehende schlechtere Prognose und erhöhte Malignität<sup>[14]</sup>. Das Laktat wird in der Glykolyse via LDH aus Pyruvat produziert. In verschiedenen Tumorentitäten, z.B. im Ösophaguskarzinom sowie im hepatozellulären Karzinom, konnte bereits ein verringertes Tumorzellwachstum sowie -migration durch ein „*knock-down*“ der LDHA gezeigt werden<sup>[13, 29]</sup>.

Im einem anschließenden Stoffwechselschritt wird das Laktat über membranständige Monocarboxylat-Transporter (MCT), insbesondere MCT1 und 4, aus den Tumorzellen geschleust. MCT4 werden durch HIF-1alpha unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert und sorgen für einen vermehrten Efflux von Laktat in das umgebende Tumormilieu<sup>[71]</sup>. Bereits 1995 konnte man in CHO-Tumorzellen eine NSAR-induzierte Reduktion des Laktattransports via MCT beobachten<sup>[72]</sup>. Dasselbe konnten Emoto et al. in Untersuchungen an der Plazentaschranke bestätigen. Hier fand sich ebenfalls eine Inhibition des MCT-vermittelten Laktattransportes durch den Einsatz von NSAR<sup>[73]</sup>. Diese Beobachtungen machen diese membranständigen Transporter als Therapieansatz attraktiv. So wurde in Glioblastomzellen (U87), die vor allem MCT1 und 2 exprimieren, ein „*Silencing*“ der MCTs durch siRNA-Moleküle erzielt. Hierdurch kam es aufgrund einer intrazellulären Laktatakkumulation zu einer Inhibition der Glykolyse sowie zum Zelltod<sup>[74]</sup>.

All diese Ergebnisse lassen den Glukosemetabolismus als therapeutischen Ansatzpunkt attraktiv erscheinen. Es ist zu vermuten, dass mit einer gezielten medikamentösen Beeinflussung dieser Stoffwechselschritte die Prognose von Tumorpatienten verbessert werden kann.



## 2 Zielsetzung

In der modernen Medizin ist man zunehmend mit dem Problem der immer älter werdenden Bevölkerung konfrontiert. Demzufolge spielen auch Tumorerkrankungen eine immer größere Rolle und stellen einen wichtigen Kernpunkt der medizinischen Forschung dar.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) einen protektiven Effekt bezüglich Tumorentstehung und -wachstum haben und möglicherweise sogar einen Überlebensvorteil für Patienten bewirken. Neben der Inhibition der Cyclooxygenase (COX1/2) können NSAR auch über andere Mechanismen die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen.

In der vorliegenden Dissertation sollte der Einfluss verschiedener NSAR auf den Energiestoffwechsel, insbesondere den Glukosemetabolismus, sowie Wachstumsverhalten und Atmungsaktivität unterschiedlicher Tumorzelllinien untersucht werden, da eine verstärkte Glukoseaufnahme wichtig für die wachsenden Tumorzellen ist.

Im Einzelnen wurde die Wirkung der unselektiven COX-Hemmer Acetylsalicylsäure (ASS), Ibuprofen, Diclofenac, Diflunisal und des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 auf Tumorzellen aus einem malignen Melanom (MelIM), Prostata-Karzinom (PC3), Lymphom (U937), Nierenzell-Karzinom (RCL1503) und einem Gliom (U87) analysiert. Diese Untersuchungen sollten klären, inwieweit NSAR neben den bereits bekannten Wirkmechanismen auch über die Hemmung des Energiestoffwechsels Tumorzellen inhibieren können. Dies würde erklären, dass auch COX-negative Tumorzellen durch NSAR beeinflussbar sind.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Autoklav	Technomara, Fernwald, Deutschland
ADVIA 1650	Bayer, Tarrytown, NY, USA
Bioanalyzer	Agilent, Waldbronn, Deutschland
FluoSTAR OPTIMA	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Heat Sealer Fermant 400	Josten & Kettenbaum, Bensberg, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laminar air flow cabinet Lamin Air HA 2472	Heraeus, Osterode, Deutschland
Mikroskope	Zeiss, Jena, Deutschland
Multipipettor (Multipette plus)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND 1000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Netzgeräte	Biometra, Göttingen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ-Research/Biometra, Oldendorf, Deutschland
pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland
Photometer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Picofuge	Heraeus, Osterode, Deutschland
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SDR SensorDish Reader	PreSens, Regensburg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries Inc., New York, NY, USA
Wallac Harvester	PerkinElmer, Gaithersburg, MD, USA
Wallac Betaplate Counter	PerkinElmer, Gaithersburg, MD, USA
Wasserreinigungsanlage	Millipore, Eschborn, Deutschland

Wasserbad	Julabo, Seelstadt, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 3.0 R	Heraeus, Osterode Deutschland

**Tabelle 3-1 Geräte**

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma, Ort
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Dispenserspitzen für Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalkanülen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einmalpipetten	Costar, Cambridge, MA, USA
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Heat sealing film	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Kunststoffschaber	Costar, Cambridge, MA, USA
Multiwell Zellkulturplatten und Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
OxoDishes (24 Vertiefungen)	PreSens, Regensburg, Deutschland
PCR Platten Twin.tec 96-Well	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UniFilterplatten	Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland
Zellkultur-Flaschen und -Pipetten	Costar, Cambridge, MA, USA
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland

**Tabelle 3-2 Verbrauchsmaterialien**

### 3.1.3 Chemikalien, Kits und Reagenzien

Reagenzien, Kits	Firma, Ort
Arginin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ASS	Fagron, Barsbüttel, Deutschland

β-Mercaptoethanol	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Diclofenac	Fagron, Barsbüttel, Deutschland
Diflunisal	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
dNTPs	NEB, Frankfurt, Deutschland
DMEM	PAA, Cölbe, Deutschland
FCS	PAA, Cölbe, Deutschland
Glukose (HK) Assay Kit GAHK-20	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MycoAlert Mycoplasma Detection-Assay	Cambrex, Rockland, ME, USA
NS-398	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PBS	PAA, Cölbe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
QuantiFast SYBR green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random-Decamer-Primer	Ambion, Darmstadt, Deutschland
reverse Transkriptase M-MLV	Promega, Mannheim, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	Amersham Pharmacia, Piscatone, NJ, USA

**Tabelle 3-3 Chemikalien und Reagenzien**

Weitere nicht in obiger Tabelle aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von den Herstellern Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Für alle eingesetzten Puffer, Reaktionsansätze und Lösungen wurde ausschließlich Millipore-gereinigtes, entionisiertes Wasser oder DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O<sub>USB</sub> der Firma Amersham (Braunschweig, Deutschland) verwendet.

### 3.1.4 RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen

Beschreibung	Gen		Sequenz 5' → 3'
18S rRNA	<i>RN18S1</i>	forward	ACCGATTGGATGGTTTAGTGAG
		reverse	CCTACGGAAACCTTGTTACGAC
Glukose-transporter 1	<i>GLUT1</i>	forward	AACTCTTCAGCCAGGGTCCAC
		reverse	CACAGTGAAGATGATGAAGACGTAGGG

HIF-1 $\alpha$	<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	forward	GTGCTGATTTGTGAACCCATTCCT
		reverse	CTTCTGGCTCATATCCCATCAATTCGG
Laktat-dehydrogenase A	<i>LDHA</i>	forward	GGTTGGTGCTGTTGGCATGG
		reverse	TGCCCCAGCCGTGATAATGA
Laktat-dehydrogenase B	<i>LDHB</i>	forward	GATGGTGGTTGAAAGTGCCTATGAAGTC
		reverse	AGCCACACTTAATCCAATAGCCCA
Monocarboxylat-transporter 1	<i>MCT1</i>	forward	GCAGCTTCTTTCTGTAACACCGT
		reverse	GTCGCCTCTTGTAGAAATACTTGCC

**Tabelle 3-4 Primer**

### 3.1.5 Tumorzelllinien

In allen unten aufgeführten Tumorzelllinien handelt es sich um Zellen aus dem Organismus *Homo sapiens*.

Zelllinie	Gewebe	Tumortyp
MeIM	Haut	Malignes Melanom
PC3	Prostata	Prostatakarzinom
RCL1503	Niere	Nierenzellkarzinom
U87	Gehirn	Glioblastom
U937	Blut (Monozyt/Makrophage)	Histiozytäres Lymphom, Leukämie

**Tabelle 3-5 Zelllinien**

### 3.1.6 Software

Software	Hyperlink
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
Graphpad Prism 5	<a href="http://www.graphpad.com/prism">http://www.graphpad.com/prism</a>
Microsoft Office 2003, 2007, 2010	<a href="http://www.microsoft.com">http://www.microsoft.com</a>
Openoffice.org 3.1	<a href="http://www.openoffice.org">http://www.openoffice.org</a>
PerlPrimer 1.1.14	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net">http://perlprimer.sourceforge.net</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez</a>
SensorDish-Reader-Software	PreSens, Regensburg
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>

**Tabelle 3-6 Software**

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellbiologische Methoden**

In den Versuchen wurden Tumorzellen aus malignem Melanom (MelIM), Prostatakarzinom (PC3), Glioblastom (U87), Leukämie/Lymphom (U937) und Nierenzellkarzinom (RCL1503) eingesetzt. Alle verwendeten Tumorzelllinien sind humanen Ursprungs. Es wurde ausschließlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

#### **3.2.1.1 Kultur und Passage von Tumorzelllinien**

Standardmäßig wurden die verwendeten Tumorzelllinien in RPMI 1640- oder DMEM-Nährmedium (PAA, Cölbe, Deutschland) kultiviert. Hierbei wurde für die Zelllinien MelIM, RCL1503, PC3 und U937 das RPMI 1640, für die Glioblastom-Linie U87 das DMEM verwendet.

Die Nährmedien wurden mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (PAA, Cölbe, Deutschland), 100µg/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein, Deutschland) und 2mM L-Glutamin (BiochromAG, Berlin, Deutschland) versetzt. Alle 5-6 Tage wurden die Zellen passagiert und im Verhältnis 1:10 in frisches Medium eingesät.

Dafür wurden adhärente Zellen nach Erreichen der Konfluenz zunächst einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden durch Zugabe von 1ml 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA-Lösung (Trypsin: PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und Inkubation für 3-5 Minuten bei 37°C im Brutschrank die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in 9ml Medium aufgenommen und abzentrifugiert (300xg, 8min). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgegossen, die Zellen in 1ml Medium resuspendiert und neu ausgesät.

Inkubationsbedingungen: 37°C, 5% (RPMI) bzw. 10% (DMEM) CO<sub>2</sub>

#### **3.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität von Zelllinien**

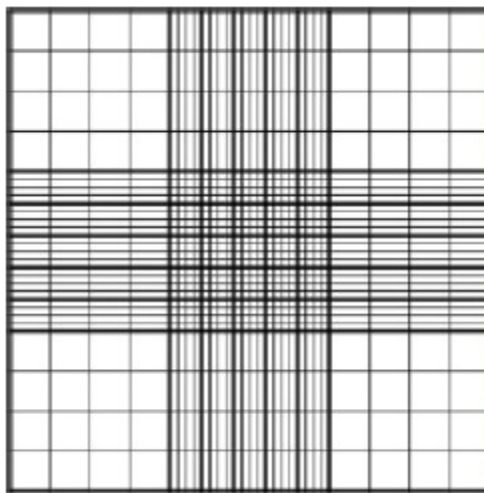
Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in Trypanblau-Lösung auf eine auszählbare Konzentration verdünnt. Dies erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens an 0,2%-iger Trypanblau-Lösung (0,2% (w/v) (0,2g) Trypanblau *ad* 100ml NaCl-Lösung (0,9%)) zur Zellsuspension. Durch die verwendete Trypanblau-Lösung lassen sich lebende von toten Zellen unterscheiden. Tote Zellen lagern aufgrund ihrer porösen Zellmembran Trypanblau ein und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau, wohingegen vitale

Zellen hell leuchten. Zum Zählen der Zellen wurde die Neubauer Zählkammer (Abbildung 3-1) verwendet. Die Zellzahl wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = Z \cdot V \cdot 10^4$$

Z = Durchschnitt der pro Eckquadrat gezählten Zellen (1 Eckquadrat besteht aus 16 Subquadraten und hat eine Fläche von  $1\text{mm}^2$ )

V = Verdünnungsfaktor



**Abbildung 3-1 Neubauer Zählkammer** (nach<sup>[19]</sup>)

### 3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Tumorzelllinien

Die Zellen wurden geerntet und mit kaltem 1640 RPMI-Medium, welches 10% FCS enthielt, auf eine Konzentration von  $2\text{-}3 \times 10^6 / 800\mu\text{l}$  eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in ein Kryoröhrchen pipettiert, in dem  $160\mu\text{l}$  DMSO und  $640\mu\text{l}$  FCS vorgelegt waren. Um eine langsame Temperaturerniedrigung zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in mit Isopropanol gefüllten Kryobehältern über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in normale Kryoboxen gestellt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, eine kurzzeitige Lagerung erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

#### **3.2.1.4 Mykoplasmentest**

Zum Ausschluss einer Kontamination mit Mykoplasmen wurden die Zelllinien in regelmäßigen Abständen getestet. Dazu wurde der MycoAlert® Mycoplasma Detection-Assay (Cambrex, Rockland, ME, USA) entsprechend des Protokolls des Herstellers verwendet.

#### **3.2.1.5 <sup>3</sup>H-Thymidin Assay (Proliferationstest)**

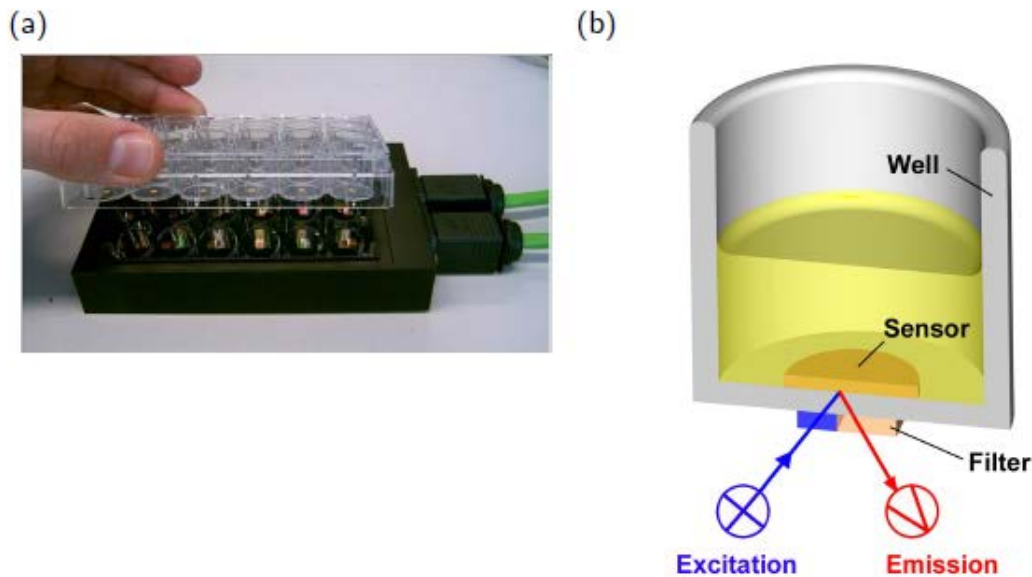
Das Proliferationsvermögen von medikamentös behandelten Tumorzellen wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin (<sup>3</sup>H-Thymidin) gemessen. Dazu wurden die Zellen in 96-Well-Platten in einer Konzentration von 30000/200µl pro Well (n=5) ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% bzw. 10% (U87 in DMEM) CO<sub>2</sub> waren die Zellen adhärent, woraufhin 0,5µCi (=0,00185MBq) [Methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben wurde.

Die Zellen wurden erneut für 24h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit einem Wallac-Harvester (PerkinElmer, Gaithersburg, MD, USA) auf UniFilter-Platten übertragen. Die eingebaute Radioaktivität gilt als Maß für die Proliferationsrate und wurde mit einem Wallac Betaplate-Counter (Perkin-Elmer, Gaithersburg, MD, USA) gemessen.

#### **3.2.1.6 O<sub>2</sub>-Kinetik mit dem SDR SensorDish®-Reader**

Zur kinetischen Analyse des Sauerstoffverbrauchs von Melanom-Tumorzellen wurde der SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland) verwendet. Die eingesetzten 24-Well-Platten besitzen optische Sensoren zur Sauerstoff-Messung (OxoDish®), die auf dem Boden jeder Vertiefung fixiert sind (Abb. 3-2b).





### Abbildung 3-2 PreSens-Technologie

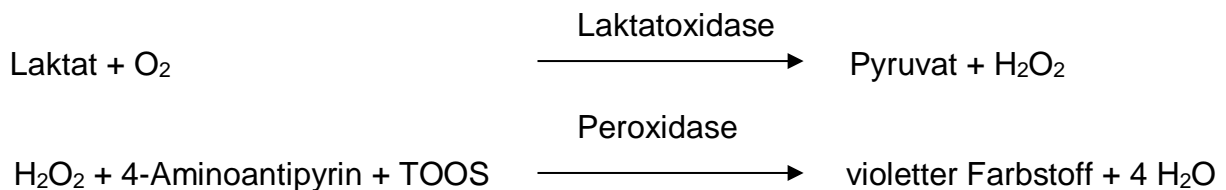
Dargestellt ist das Prinzip des SDR SensorDish®-Readers der Firma PreSens. Auf Abbildung (a) sieht man eine Messeinheit mit der korrespondierenden 24-Well-Platte. Diese wird während der Messung in den Brutschrank gestellt und über ein Kabel mit einem Computer verbunden. Abbildung (b) verdeutlicht das Prinzip der optischen Messung. Am Boden jedes Wells findet sich ein optischer Sensor, in den ein lumineszenter Farbstoff eingelagert ist und dessen Analyten-sensitive Emission vom SensorDish® Reader detektiert wird. Diese Signale werden von einer Software in definierte Sauerstoff-Einheiten umgerechnet (modifiziert nach <sup>[19]</sup>).

Die Sensoren bestehen aus einem lumineszenten Farbstoff, der in ein Analyten-sensitives Polymer eingelagert ist. Diese werden vom SensorDish®-Reader, auf dem die 24-Well-Platte während der Messung platziert wird (Abb. 3-2a), ausgelesen und die Daten von der zugehörigen Software verarbeitet. Die Signale werden von der Software über Kalibrierungsparameter in definierte Sauerstoff-Einheiten umgerechnet. Die Messung wird im Brutschrank durchgeführt, wobei die Messeinheit (24-Well-Platte + SDR SensorDish®-Reader) während der gesamten Messung über ein Kabel mit einem Computer verbunden ist. Für die Messung wurden die Tumorzellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/1ml pro Well ( $n=2$ ) in die 24-Well-Platten ausgesät, mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen NSAR versetzt und anschließend der  $O_2$ -Verbrauch über 24h gemessen.

#### 3.2.1.7 Laktatmessung in Zellkulturüberständen

Die Tumorzellen wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/1ml ausgesät und mit aufsteigenden Konzentrationen von NSAR versetzt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Laktat-Konzentration in den Zellkulturüberständen nach 48h in

Kooperation mit der klinischen Chemie der Universitätsklinik Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Gerd Schmitz. Hierfür wurde ein enzymatischer Test an einem ADVIA 1650 eingesetzt, verwendet wurden Reagenzien von Roche (Mannheim, Deutschland). Der enzymatische Test basiert darauf, dass die Laktat-Konzentration im Zellkulturüberstand proportional zur ablaufenden Reaktion



ist. Dabei wird Laktat durch die Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das hierbei entstandene Wasserstoffperoxid bildet zusammen mit einem Chromogen in Gegenwart einer Peroxidase einen Farbstoff. Dieser kann mittels Spektrophotometrie gemessen werden.

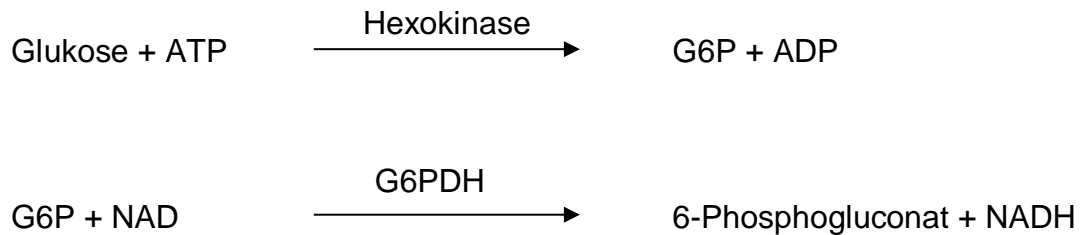
[TOOS = N-Ethyl-N-(2hydroxy-3-sulfopropyl) m-toluidin]

### 3.2.1.8 Glukosemessung in Zellkulturüberständen

Die Messung von Glukose in Zellkulturüberständen (Herstellung der Überstände analog zu 3.2.1.7) der Tumorzelllinie MellM fand in Zusammenarbeit mit der funktionellen Genomik im Biopark der Universität Regensburg statt.

Mit Hilfe des FluoSTAR OPTIMA (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) wurde unter Verwendung des Glukose (HK) Assay Kit der Firma SIGMA (St. Louis, MD, USA) nach beiliegendem Protokoll die Glukose-Konzentration im Kulturüberstand der Tumorzellen nach Behandlung mit verschiedenen NSAR photometrisch bei einer Wellenlänge von 340nm ermittelt.

Die hier erwähnte Methode basiert auf folgendem Reaktionsprinzip:



[G6P = Glukose-6-Phosphat]

[G6PDH = Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase]

[NAD/ NADH = Nicotinamidadenindinukleotid]

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Insbesondere bei der Arbeit mit RNA ist ein sorgfältiges Vorgehen erforderlich, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Hierzu wurde strikt mit Handschuhen, RNase-freien Gefäßen und Pipetten gearbeitet.

Alle Lösungen wurden ausschließlich mit RNase-freiem Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>) hergestellt. Dafür wurde zweifach destilliertes Millipore-Wasser mit 0,1% DEPC versetzt, mehrmals geschüttelt und über Nacht inkubiert.

Durch zweifaches Autoklavieren wurde DEPC anschließend inaktiviert. RNA-Pellets wurden in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>USB</sub> von der Firma Amersham (Braunschweig, Deutschland) resuspendiert.

#### 3.2.2.1 RNA-Isolierung aus Tumorzellen

Für die Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene per Real-time quantitativer PCR wurde unter Verwendung des „RNeasy Mini Kits“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) RNA aus den Tumorzellen isoliert.

Die Zellen, die über Nacht in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/2ml in 6-Well-Platten ausgesät worden waren, wurden am darauffolgenden Tag zuerst einmal mit 2ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie unter dem Abzug in 350µl RLT-Puffer (QIAGEN RNeasy-Kit) mit β-Mercaptoethanol versetzt und mit Hilfe einer 1ml-Spritze und einer gelben Spitze lysiert.

Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und sofort auf Eis überführt. Zur Scherung vorhandener genomischer DNA wurde das Lysat 5-6 Mal in einer 1ml-Spritze mit einer blauen Kanüle aufgezogen.

Die Integrität der RNA wurde mit dem Agilent Bioanalyzer (Waldbronn, Deutschland) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zuletzt erfolgte die Konzentrationsbestimmung der zuvor isolierten RNA mittels des Spektralphotometers Nanodrop ND1000 (PeqLab, Erlangen, Deutschland).

### 3.2.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Durchführung der mRNA-Expressionsanalysen per Real-time quantitativer PCR muss aus der isolierten RNA zunächst komplementäre (copy) DNA (cDNA) synthetisiert werden.

Dies erfolgt mit Hilfe der reversen Transkriptase aus einem murinen Leukämie-Virus (Stamm Moloney) (M-MLV), DekaNukleotid-Primern mit zufälliger Sequenz (Random-Decamer-Primer) und 2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphaten (dNTPs).

Hierfür wurde standardmäßig pro Probe 500ng RNA in einem Gesamtreaktionsansatz von 20µl umgeschrieben.

Reaktionsansatz (auf Eis pipettiert):	RNA (500ng)	xµl
	RNAse freies H <sub>2</sub> O	13-xµl
	Random-Decamere (10µM)	1µl
	dNTPs (10µM)	1µl

- 5min bei 65°C inkubieren, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, auf Eis stellen, abzentrifugieren
- +4µl 5xM-MLV Puffer
- mischen und 2min bei 42°C inkubieren
- +1µl M-MLV reverse Transkriptase
- 50min bei 42°C inkubieren
- 15min bei 70°C inkubieren

### 3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt die *in-vitro*-Amplifikation großer Mengen spezifischer DNA-Abschnitte im Genom innerhalb kürzester Zeit. Benötigt werden hierfür generell ein DNA-Template, eine thermostabile DNA-Polymerase und sequenzspezifische Primer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Im folgenden Abschnitt werden Bedingungen und Reagenzien für eine Standard-PCR beschrieben.

### 3.2.2.3.1 Primerdesign

Sequenzen der genomischen DNA für das Primerdesign wurden aus der Onlinedatenbank „Ensembl Genome Browser“ (<http://www.ensembl.org>) bezogen. Die Primer wurden mit der Software „Perlprimer“ (<http://perlprimer.sourceforge.net>) konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Oligosequenzen einen CG-Gehalt von ca. 40-60% aufwiesen. Für die Primer galten folgende Kriterien:

Schmelztemperatur	65-68°C
Länge	18-28bp
Amplikon-Länge	70-200bp

Mittels BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) und *in-silico*-PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?db=hg18>) erfolgte die Kontrolle der Spezifität der Primer, um die Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte zu verhindern. Um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, wurden die RT-qPCR Primer zur Quantifizierung von mRNA auf zwei benachbarte Exons, die ein Intron umspannen, gelegt. Bestellt wurden die Primer bei Metabion (<http://www.metabion.com>, Martinsried, Deutschland).

### 3.2.2.3.2 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Die Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) zur Quantifizierung von Nukleinsäuren basiert auf der Erzeugung fluoreszierender PCR-Produkte. Der Farbstoff SYBR® Green I wird zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben, interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert in gebundenem Zustand. Die Fluoreszenz steigt proportional mit zunehmender Anzahl an PCR-Produkten. Diese kann in einer mit UV-Lampe und CCD-Kamera ausgestatteten PCR-Maschine am Ende jedes Zyklus gemessen werden. Somit kann die zu Beginn vorhandene Menge an Nukleinsäuren über die Kinetik der PCR-Reaktion bestimmt werden. Es werden also keine absoluten Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern relative Unterschiede zwischen verschiedenen Proben bezüglich eines internen Standards.

Die RT-qPCRs wurden in twintec-96-Well-Platten an einem Realplex Mastercycler epGradient S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, das Reaktionsgesamtvolumen der Ansätze betrug 10µl. Für die RT-qPCR wurde der „QuantiFast SYBR Green-Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Reaktionsansatz:	QuantiFast SYBR Green PCR Mix	5µl
	cDNA (mind. 1:5 verd.)	1µl
	Primer sense (10µM)	0,5µl
	Primer asense (10µM)	0,5µl
	RNAse free H <sub>2</sub> O	3µl

Die cDNA wurde dabei mindestens 1:5 verdünnt. Um valide Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle Proben in Triplikaten gemessen.

Standardprogramm für die RT-qPCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5min
Denaturierung	95°C	8s *
Annealing/ Elongation	60°C	20s *
Schmelzkurve	95°C	15s
	65°C	15s
	65°C-95°C	10min

\* 45 Zyklen

**Tabelle 3-7 Ablauf RT-qPCR**

Zur Bildung der Standardgeraden wurde bei jeder RT-qPCR-Messung neben den zu analysierenden Proben eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) mit einer für das zu untersuchende Gen positiven Probe mitgeführt.

Mit Hilfe der Standardgerade (*slope*) und des Schnittpunkts der Standardgeraden mit dem y-Achsenabschnitt (*y-intercept*) berechnet die Realplex-Software die relative Menge an cDNA in den analysierten Proben. Die spezifische Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts wurde anhand des Verlaufs der Schmelzkurve kontrolliert. Die erhaltenen Daten wurden in „Microsoft Excel 2003“ importiert und auf die jeweilige Menge von 18S-rRNA, welche in den Proben ebenfalls mittels RT-qPCR ermittelt wurde, normalisiert.

### 3.3 Statistik

Die erhaltenen Messwerte wurden gemittelt, daraufhin wurde die Standardabweichung des Mittelwerts (STABW) berechnet. Signifikanzen zwischen zwei verschiedenen Ansätzen wurden mit Hilfe der Software „Graphpad Prism 5“ unter Anwendung des ungepaarten Student's t-Test bestimmt. Ein P-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant (\*),  $<0,01$  als sehr signifikant (\*\*) und  $<0,001$  als hoch signifikant (\*\*\*) betrachtet. P-Werte von  $>0,05$  galten als nicht signifikant (n.s.).

## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation konzentriert sich auf die Untersuchung von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) als in der Praxis weit verbreitet eingesetzte Schmerzmedikamente. Untersucht wurden die Effekte dieser Pharmaka auf den Metabolismus und das Proliferationsverhalten verschiedener Tumorzelllinien. Ibuprofen wird im Praxisalltag in Tagesdosierungen von bis zu 2400mg<sup>[75]</sup> verwendet, und auch Acetylsalicylsäure (ASS) kann bis zu 3000mg<sup>[76]</sup> täglich dosiert werden. Diflunisal setzt man in einer Maximalmenge von 1500mg pro Tag ein<sup>[77]</sup>, wohingegen die Tageshöchstdosis des NSAR Diclofenac 150mg<sup>[78]</sup> beträgt.

Die selektiven COX-2-Hemmer, wie z.B. Celecoxib, werden in Höchstdosen von 400mg täglich verwendet<sup>[79]</sup>. Der Vertreter dieser Klasse, den wir in unseren Experimenten untersuchten, ist NS-398. Dieser ist bislang klinisch nicht routinemäßig im Einsatz, er wurde entsprechend Vorarbeiten in den Konzentrationen 0,01mM bis 0,1mM verwendet.

### 4.1 Einfluss von NSAR auf das Proliferationsverhalten von Tumorzelllinien

#### 4.1.1 Die Melanom-Zelllinie MelIM

Das maligne Melanom ist allgemein als hoch aggressiver Tumor mit großem Metastasierungspotential bekannt. Aufgrund dessen untersuchten wir zunächst, inwieweit das Proliferationsverhalten dieser aggressiv wachsenden Tumorzellen durch NSAR beeinflusst werden kann.

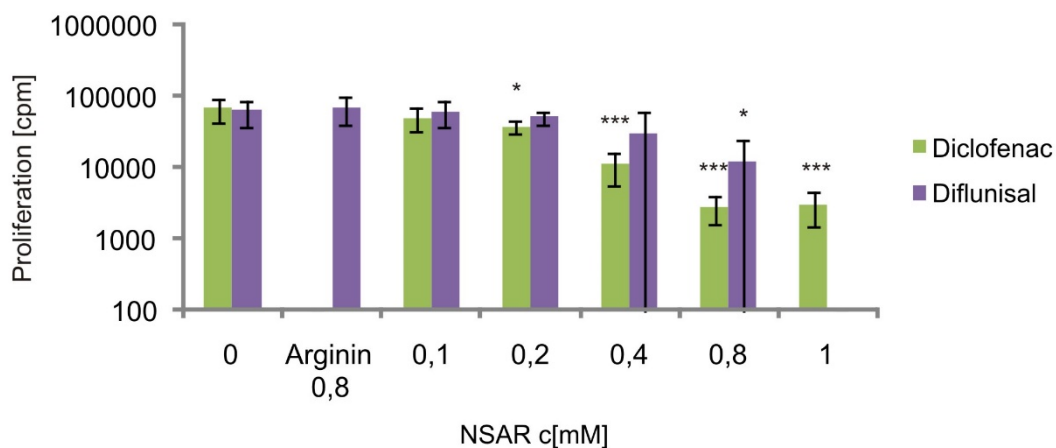
Die zuvor in RPMI-Medium kultivierten Tumorzellen der Melanom-Linie MelIM wurden geerntet und in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit verschiedenen NSAR (Ibuprofen, ASS, Diclofenac und Diflunisal) in aufsteigenden Konzentrationen versetzt und nach zweistündiger Inkubation im Brutschrank mit radioaktivem Thymidin gelabelt. Nach erneuter Inkubation für 24h konnte mit dem Wallac Betaplate Counter die Proliferationsrate indirekt über die eingebaute Radioaktivität bestimmt werden.

Es wurde jeweils eine Medium-Kontrolle ohne Medikamentenzusatz sowie in den Experimenten mit Diflunisal eine Kontrolle mit Arginin (Lösungsmittel für Diflunisal) mit



untersucht. Bei allen in diesem Experiment verwendeten NSAR handelt es sich um unselektive COX-Hemmer mit Einfluss auf COX-1 und -2.

Aus Abb. 4-1 wird deutlich, dass durch die Zugabe von Diclofenac und Diflunisal die Proliferationsrate von MelM-Zellen supprimiert werden kann. Besonders deutlich war dieser Effekt nach Zugabe von Diclofenac zu beobachten. Hier führte bereits eine Konzentration von 0,2mM zu einer signifikanten, 0,4mM zu einer hoch signifikanten Reduktion der Wachstumsrate des Tumors. Auch Diflunisal erzielte ähnliche Ergebnisse, hier wurde allerdings erst ab einer effektiven Konzentration von 0,8mM ein signifikanter Rückgang der Proliferation beobachtet. Durch eine weitere Erhöhung der Konzentration von Diflunisal konnte keine Steigerung der Proliferationshemmung bewirkt werden, weshalb höhere Konzentrationen nicht weiter untersucht wurden.

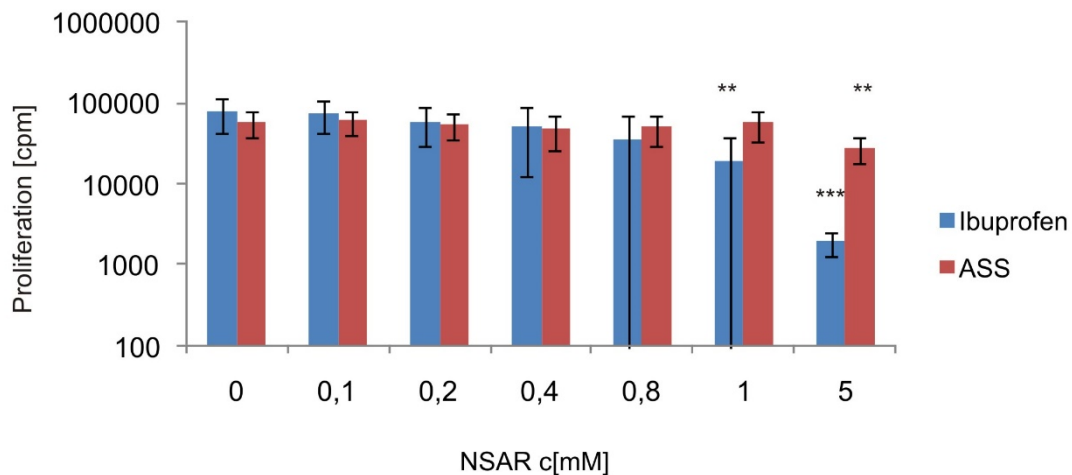


**Abbildung 4-1 Bestimmung der Proliferationsrate von humanen Melanom-Zellen nach Behandlung mit den NSAR Diclofenac und Diflunisal**

Von MelM-Tumorzellen, die mit Diclofenac und Diflunisal behandelt worden waren, wurde die Proliferationsrate bestimmt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 30000 Zellen/Well in 96-Well-Platten angesetzt, mit dem jeweiligen NSAR in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8/1,0mM (Diflunisal 0,1 - 0,8mM) für 2h inkubiert und zur Proliferationsmessung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin gelabelt. Nach weiteren 24h Inkubation wurde die Proliferationsrate (cpm) anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus an einem Beta-Plate-Counter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz bzw. Zellen plus Arginin) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Hingegen fällt auf, dass durch Acetylsalicylsäure (ASS) in niedrigen Konzentrationen nur ein marginaler Effekt auf die Proliferation der Melanomzelllinie festgestellt wurde. Erst der Einsatz der höchsten Konzentration von 5,0mM ASS bewirkte einen signifikanten Rückgang der Proliferation. Das NSAR Ibuprofen erzielte ebenfalls erst

in höheren Konzentrationen ab 1,0mM einen signifikanten Effekt. Beide NSAR werden klinisch deutlich höher dosiert eingesetzt als Diclofenac. Allerdings werden weder bei Ibuprofen noch bei ASS diese hohen Konzentrationen im Plasma von Patienten erreicht.



**Abbildung 4-2 Bestimmung der Proliferationsrate von humanen Melanom-Zellen nach Behandlung mit den NSAR Ibuprofen und ASS**

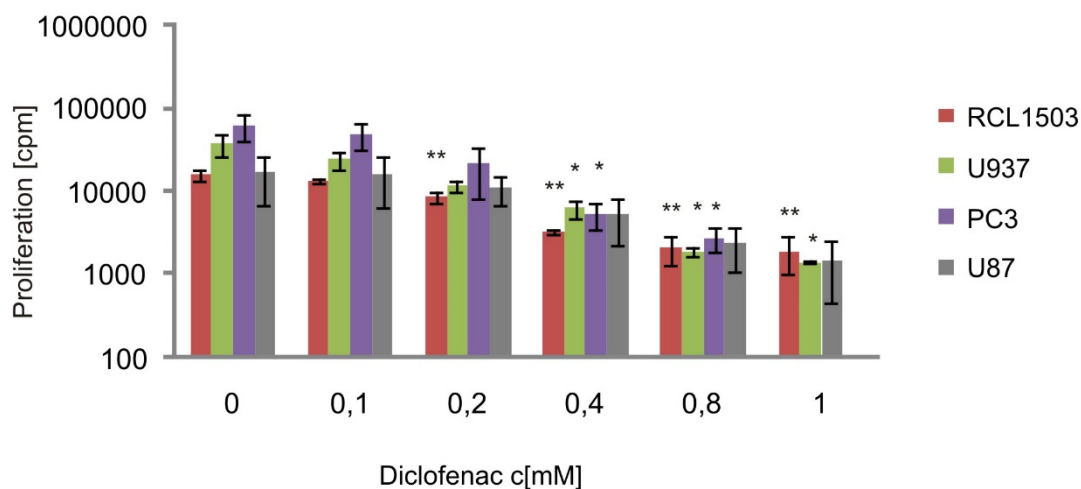
Von MelM-Tumorzellen, die mit den NSAR Ibuprofen und ASS behandelt worden waren, wurde die Proliferationsrate bestimmt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 30000 Zellen/Well in 96-Well-Platten angesetzt, mit dem jeweiligen NSAR in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8/1,0/5,0mM für 2h inkubiert und zur Proliferationsmessung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin gelabelt. Nach weiteren 24h Inkubation wurde die Proliferationsrate (cpm) anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus an einem Beta-Plate-Counter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Die substanzspezifischen Unterschiede hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Tumorzellen lassen vermuten, dass dieser Einfluss nicht ausschließlich auf einer Hemmung der Cyclooxygenase - als Charakteristikum dieser Medikamentengruppe - beruht.

### 4.1.2 Das NSAR Diclofenac als beispielhafte Substanz

Da Diclofenac im oben gezeigten Versuch bereits in relativ niedrigen Konzentrationen das Wachstum der Melanom-Zelllinie inhibierte, stellte sich die Frage, ob vergleichbare Ergebnisse auch bei anderen Tumorzelllinien erzielt werden können.

Im Folgenden ist der Einfluss des NSAR Diclofenac auf die Tumorzelllinien RCL1503 (Nierenzell-Karzinom), U937 (Lymphom), PC3 (Prostata-Karzinom) und U87 (Gliom) dargestellt.



**Abbildung 4-3 Bestimmung der Proliferationsrate von verschiedenen humanen Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem NSAR Diclofenac**

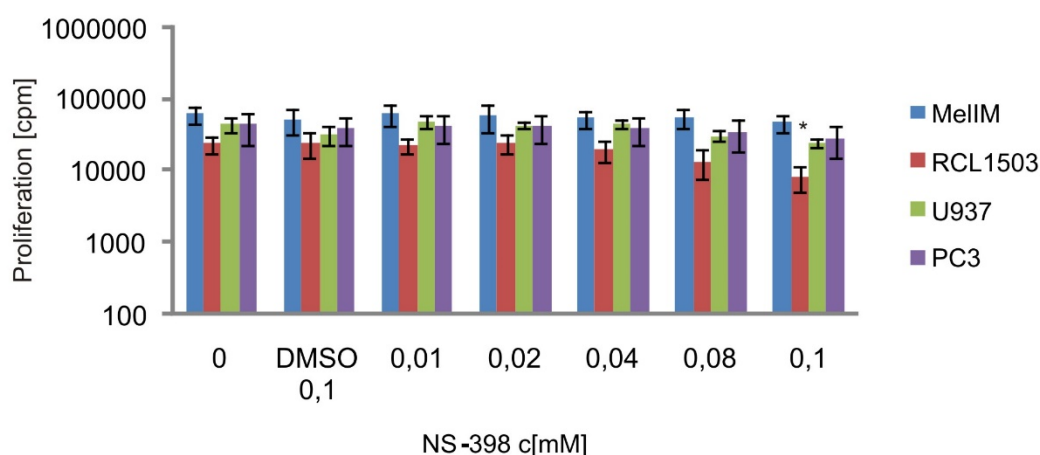
Von den Tumorzelllinien RCL1503, U937, PC3 und U87, die mit Diclofenac behandelt worden waren, wurde die Proliferationsrate bestimmt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 30000 Zellen/Well in 96-Well-Platten angesetzt, mit dem jeweiligen NSAR in den Konzentrationen 0, 1/0,2/0,4/0,8/1,0mM (PC3 0,1mM - 0,8mM) für 2h inkubiert und zur Proliferationsmessung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin gelabelt. Nach weiteren 24h Inkubation wurde die Proliferationsrate (cpm) anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus an einem Beta-Plate-Counter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Es wurde deutlich, dass der proliferationshemmende Effekt des Diclofenac nicht spezifisch für die Tumorzelllinie MelM ist. Auch bei den RCL1503-Zellen zeigte sich ab einer Diclofenac-Konzentration von 0,2mM eine signifikante Verminderung des Zellwachstums, bei der Lymphomzelllinie U937 und der Prostatakarzinom-Linie PC3 wurde ein signifikanter Effekt ab einer Konzentration von 0,4mM beobachtet. Auch bei der Glioblastom-Zelllinie U87 zeigten sich tendenziell ähnliche Effekte. Diese Zellen

ließen ebenfalls ab einer Konzentration von 0,4mM Diclofenac ein reduziertes Wachstumsverhalten erkennen, allerdings war der Effekt statistisch nicht signifikant.

#### 4.1.3 COX-Selektivität als potentielle Ursache des proliferationshemmenden Effektes der NSAR - NS-398 als selektiver COX-2-Inhibitor

In verschiedenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein relevanter gewebstypischer Unterschied in der Expression der beiden Enzyme COX-1 und COX-2 besteht. Wie zu Beginn erwähnt findet sich insbesondere in Entzündungs- und Tumorgewebe eine Überexpression von COX-2. Diese Erkenntnis führte zu der Überlegung, ob die erzielten Effekte nicht ebenfalls, bzw. sogar effektiver, mit einem selektiven COX-2-Inhibitor beobachtet werden können. Im Folgenden untersuchten wir also die Wirkung des selektiven COX-2-Hemmers NS-398 auf unterschiedliche Tumorzelllinien. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Substanz und Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Lösungsmittel für NS-398) untersucht.



**Abbildung 4-4 Bestimmung der Proliferationsrate von verschiedenen humanen Tumorzelllinien nach Behandlung mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398**

Von den Tumorzelllinien MelIM, RCL 1503, U937 und PC3, die mit dem NSAR NS-398 behandelt worden waren, wurde die Proliferationsrate bestimmt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 30000 Zellen/Well in 96-Well-Platten angesetzt, mit dem jeweiligen NSAR in den Konzentrationen 0,01/0,02/0,04/0,08/0,1mM für 2h inkubiert und zur Proliferationsmessung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin gelabelt. Nach weiteren 24h Inkubation wurde die Proliferationsrate (cpm) anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus an einem Beta-Plate-Counter bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen plus DMSO) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

In allen Zelllinien war nur ein schwacher Effekt auf die Proliferation durch den verwendeten selektiven COX-2-Inhibitor zu erzielen. Lediglich in der Nierenkarzinom-Zelllinie RCL1503 bewirkte die höchste Konzentration von 0,1mM NS-398 eine signifikante Reduktion des Wachstums. In den ebenfalls durchgeführten Versuchen mit den Glioblastom-Zellen U87 war kein Effekt auf die Proliferationsrate durch Zugabe des COX-2-Hemmers zu beobachten, weshalb dieses Experiment nach zweimaliger Durchführung nicht mehr weiterverfolgt wurde (Ergebnisse nicht dargestellt).

## **4.2 Modulation des Glukose-Stoffwechsels durch NSAR**

### **4.2.1 Beeinflussung der Laktatproduktion von MelIM-Zellen durch Zugabe von unselektiven NSAR**

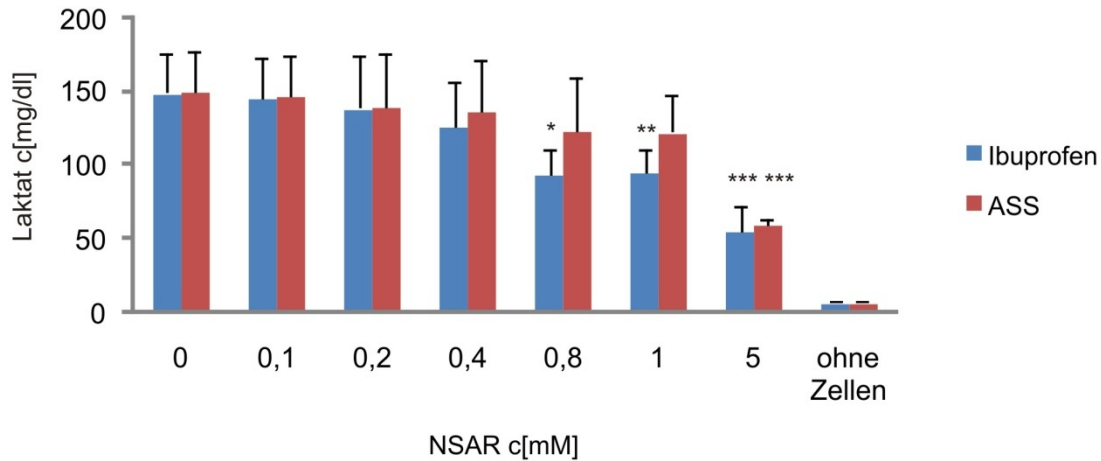
Wie bereits erwähnt decken Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen ihren Energiehaushalt nicht über die Atmungskette mit der hohen Energieausbeute von 36ATP, sondern hauptsächlich über den energetisch ineffizienteren Weg der Glykolyse (2ATP). Dies bezeichnete Warburg als die sogenannte „aerobe Glykolyse“. Das produzierte Laktat wird im Ko-Transport mit Protonen über Monocarboxylat-Transporter (MCTs) aus den Tumorzellen ausgeschleust und sorgt so für eine Ansäuerung des Tumor-Milieus. Dies scheint für den Tumor, unter anderem durch Beeinflussung der Tumor-assoziierten Immunzellen, einen Überlebensvorteil zu bedeuten, wie in Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte. In klinischen Studien war zudem zu beobachten, dass die Höhe der Laktat-Konzentration im Tumormilieu mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergeht.

Im folgenden Versuch sollte deshalb überprüft werden, ob die NSAR Ibuprofen, ASS, Diclofenac und Diflunisal einen Effekt auf die Laktat-Produktion und -Sekretion der malignen Melanom-Zelllinie MelIM haben.

Hierfür wurden die MelIM-Zellen mit dem zu untersuchenden unselektiven NSAR (Ibuprofen, ASS, Diclofenac, Diflunisal) in aufsteigenden Konzentrationen für 48h inkubiert. Anschließend wurde die Laktat-Konzentration in den Zellkulturüberständen spektrophotometrisch gemessen und mit dem Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz bzw. Zellen in Arginin als Lösungsmittel für Diflunisal) verglichen.

In Abb. 4-5 ist die Wirkung der beiden NSAR Ibuprofen und ASS abgebildet. Durch die Zugabe von Ibuprofen ab einer Konzentration von 0,8mM konnte eine signifikante Reduktion der Laktat-Konzentration im Zell-Überstand erreicht werden. Mit

Acetylsalicylsäure (ASS) in einer Konzentration von 5,0mM wurde eine ähnliche Verminderung der Laktatsekretion erzielt.



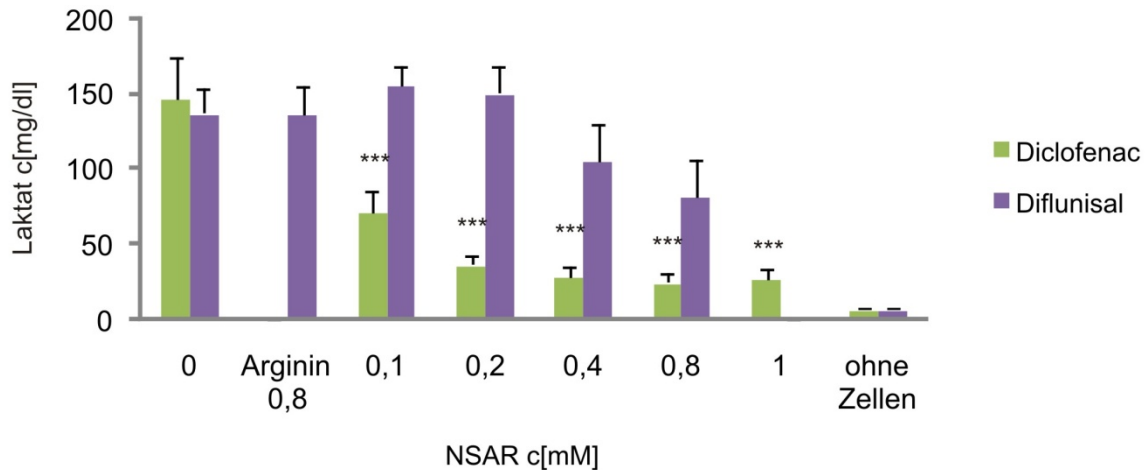
**Abbildung 4-5 Inhibition der Laktat-Sekretion durch die NSAR Ibuprofen und ASS in humanen MelIM-Zellen**

Die Tumorzellen MelIM wurden als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und mit den NSAR Ibuprofen und ASS in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8/1,0/5,0mM behandelt. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) wurden die Zellkultur-Überstände abpipettiert und anhand eines enzymatischen Tests spektrophotometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05$ \*,  $p < 0,01$ \*\*,  $p < 0,001$ \*\*\*).

In der folgenden Abbildung ist die Laktat-Konzentration im Überstand nach Zugabe von Diclofenac bzw. Diflunisal (gelöst in Arginin) gezeigt. Durch Diflunisal scheint die Laktat-Produktion bzw. -Ausschleusung aus den MelIM-Zellen zunächst geringfügig anzusteigen, wobei aber zwischen den Konzentrationen 0,2mM und 0,8mM eine deutliche Reduzierung des Laktats im Kulturüberstand zu beobachten ist. Durch die hohe Konzentration von 1,0mM konnte - wie schon bei den Proliferationsexperimenten beobachtet - kein wesentlicher Mehr-Effekt erzielt werden, weshalb diese Konzentration nicht weiter untersucht wurde und hier nicht zur Darstellung kommt.

Besonders deutlich waren die Ergebnisse, die durch die Inkubation der Tumorzellen mit dem NSAR Diclofenac erreicht wurden. Hier war bereits bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 0,1mM eine hoch signifikante Reduktion der Laktat-Konzentration im Überstand zu verzeichnen. Auffallend war, dass der Effekt des

Diclofenac auf den Glukose-Metabolismus der Tumorzellen in niedrigeren Konzentrationen auftrat als in den zuvor durchgeführten Proliferationsexperimenten.



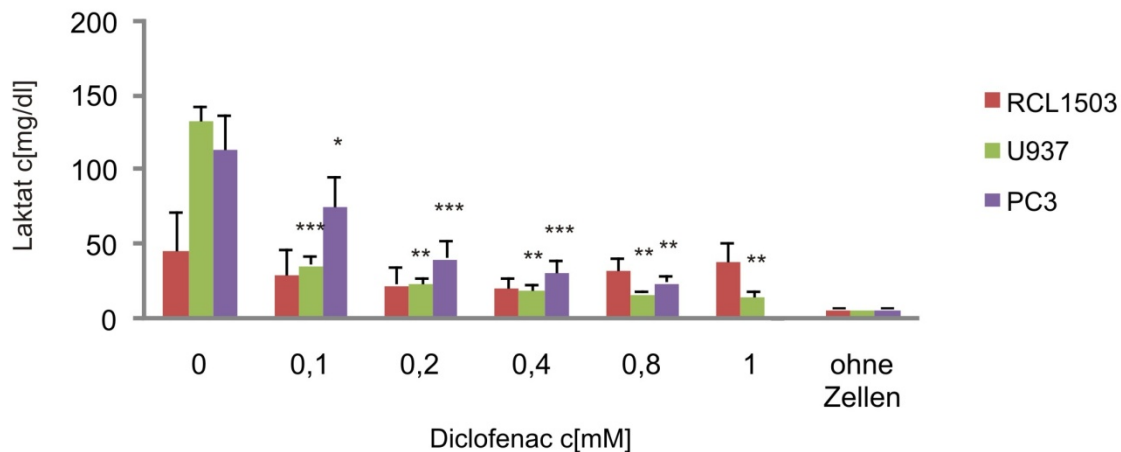
**Abbildung 4-6 Inhibition der Laktat-Sekretion durch die NSAR Diclofenac und Diflunisal in humanen MelIM-Zellen**

Die Tumorzellen MelIM wurden als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und mit den NSAR Diclofenac und Diflunisal in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8/1,0mM behandelt (Diflunisal 0,1 - 0,8mM). Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) wurden die Zellkultur-Überstände abpipettiert und anhand eines enzymatischen Tests spektrophotometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

#### 4.2.2 Beeinflussung der Laktatproduktion verschiedener Tumorzelllinien durch Diclofenac

Da Diclofenac die Laktatsekretion in MelIM-Zellen besonders effektiv inhibieren konnte, wurde der Effekt in weiteren Tumorzelllinien überprüft und die Laktat-Konzentration im Überstand der Tumorzelllinien RCL1503, U937 und PC3 nach Zugabe von Diclofenac gemessen.

Während die Nierenkarzinom-Zellen (RCL1503) keine eindeutige Reduktion der Laktat-Konzentration erkennen ließen, so konnten bei den Lymphom- (U937) und Prostatakarzinom-Zellen (PC3) bereits in der niedrigsten Konzentration von 0,1mM signifikante Effekte erzielt werden. Die PC3-Zellen wurden standardmäßig mit den Konzentrationen 0,1mM bis 0,8mM versetzt, in höheren Konzentrationen war gemäß Vorversuchen keine weitere Steigerung des Effektes zu erwarten.



**Abbildung 4-7 Inhibition der Laktat-Sekretion durch Diclofenac in verschiedenen humanen Tumorzellen**

Die Tumorzellen RCL1503, U937 und PC3 wurden als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in den 24-Well-Platten ausgesät und mit dem NSAR Diclofenac in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8/1,0mM behandelt (PC3 0,1 - 0,8mM). Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) wurden die Zellkultur-Überstände abpipettiert und anhand eines enzymatischen Tests spektrophotometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

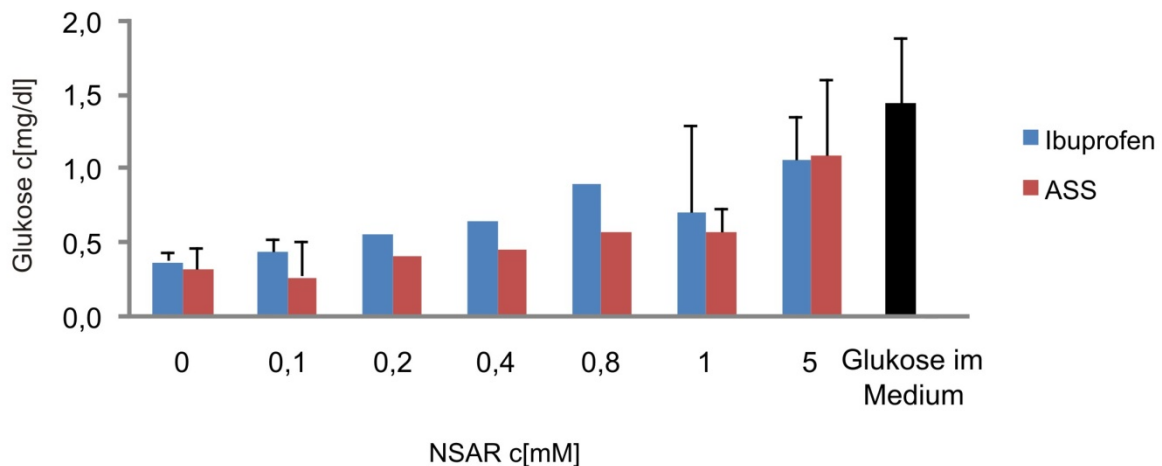
### 4.2.3 Beeinflussung des Glukose-Uptakes von MelM-Zellen durch Zugabe von NSAR

Physiologischerweise nehmen sowohl normale Körperzellen als auch transformierte Tumorzellen Glukose als essentiellen Nährstoff über membranständige Glukose-Transporter (GLUT) auf und verstoffwechseln diese unter anderem in der Glykolyse via Pyruvat zu Laktat. Dieses wiederum wird durch Monocarboxylattransporter (MCT) in das umgebende Milieu exportiert. Die oben gezeigten Untersuchungen zur Laktatproduktion der Tumorzellen nach Behandlung mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe unterschiedlicher NSAR lassen analog einen reziproken Effekt bezüglich der Glukose-Konzentration im Tumormilieu vermuten. Es ist also davon auszugehen, dass mit steigender Konzentration des zugegebenen NSAR die Glukose-Konzentration im Zellkulturüberstand ansteigen würde, möglicherweise aufgrund einer Blockade der Aufnahme in die Tumorzellen.

In den durchgeführten Experimenten wurden erneut die Melanom-Zellen MelM mit aufsteigenden Konzentrationen der unselektiven NSAR Ibuprofen, ASS, Diclofenac



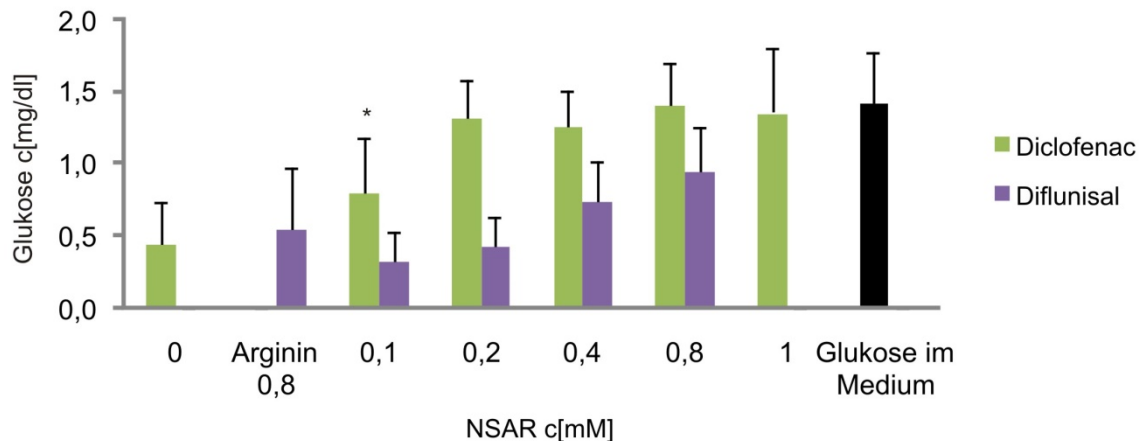
und Diflunisal inkubiert und anschließend die Glukose-Konzentration im Kulturüberstand der Tumorzellen photometrisch quantifiziert. Die gemessenen Werte wurden mit einer Null-Kontrolle (Zellen ohne Substanz bzw. Zellen plus Arginin im Fall von Diflunisal) verglichen und statistisch ausgewertet.



**Abbildung 4-8 Beeinflussung des Glukose-Uptakes durch die NSAR Ibuprofen und ASS in humanen MellM-Zellen**

Die Tumorzellen MellM wurden als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und mit den NSAR Ibuprofen und ASS in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8/1,0/5,0mM behandelt. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) wurden die Zellkultur-Überstände abpipettiert und anhand eines enzymatischen Tests photometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- STABW aus mindestens 3 Experimenten. Die Konzentrationen 0,2/0,4/0,8mM wurden jeweils zweimal gemessen. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

In Abbildung 4-8 konnten wir zeigen, dass sowohl durch die Zugabe von Ibuprofen als auch von Acetylsalicylsäure (ASS) eine konzentrationsabhängige Zunahme des Glukose-Gehaltes im Zellkulturüberstand zu erreichen war.



**Abbildung 4-9 Beeinflussung des Glukose-Uptakes durch die NSAR Diclofenac und Diflunisal in humanen MelM-Zellen**

Die Tumorzellen MelM wurden als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und mit den NSAR Diclofenac und Diflunisal in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8/1,0mM behandelt (Diflunisal 0,1 - 0,8mM). Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) wurden die Zellkultur-Überstände abpipettiert und anhand eines enzymatischen Tests photometrisch gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- STABW aus mindestens 3 Experimenten. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz bzw. Zellen plus Arginin) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ).

Abbildung 4-9 zeigt den Einfluss von Diclofenac bzw. Diflunisal auf die Glukose-Konzentration im Zellüberstand. Es konnte erneut ein Anstieg der Glukose im Überstand verzeichnet werden (signifikant bei Diclofenac 0,1mM). Wie bereits in den vorherigen Versuchen wurde auch hier Diflunisal in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe nur bis 0,8mM eingesetzt. Auch in diesen Versuchen ließ sich durch die Zugabe von Diclofenac der stärkste Effekt erzielen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch die Zugabe der NSAR die Glukose-Aufnahme in die Tumorzellen mit steigenden Konzentrationen des Medikamentes inhibiert wird. Die hieran beteiligten Glukose-Transporter (GLUT) werden in dieser Arbeit noch eingehender untersucht.

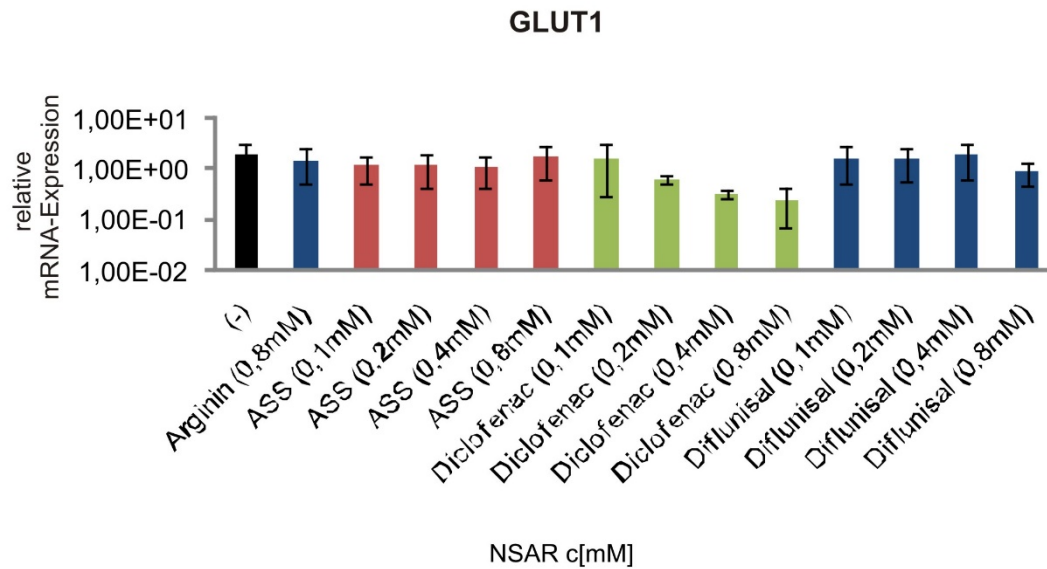
## **4.3 Pharmakologische Modulation des Glukose-Stoffwechsels auf molekularer Ebene**

### **4.3.1 Analyse des Einflusses von NSAR auf wichtige an der Glykolyse beteiligte Transporter und Enzyme**

Alle zuvor gezeigten Auswirkungen von NSAR, insbesondere auf den Glukose-Stoffwechsel, legen eine Veränderung in den Tumorzellen auch auf molekularer Ebene nahe. Deshalb untersuchten wir im Folgenden die Expression wichtiger am Glukose-Stoffwechsel beteiligter Enzyme und Transporter auf mRNA-Ebene in Tumorzellen des malignen Melanoms (MelIM). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass insbesondere der membranständige Glukose-Transporter GLUT1, der für den Transport der Glukose in die Zelle verantwortlich ist, in diesen Tumorzellen überexprimiert wird. Dasselbe gilt für die Laktatdehydrogenase A (LDHA), welche als Untereinheit der LDH die Umwandlung von Pyruvat in Laktat katalysiert. Auch findet sich in den Melanom-Zellen eine verstärkte Expression der Monocarboxylattransporter, insbesondere von MCT1, die für die Ausschleusung des Laktats aus den Zellen in die Umgebung verantwortlich sind und so eine Ansäuerung des umgebenden Tumormilieus bewirken. Eine weitere zentrale Rolle spielt der Transkriptionsfaktor HIF1-alpha, welcher eine Vielzahl an der Glykolyse beteiligter Gene reguliert.

Anknüpfend an diese Vorarbeiten sollte nun untersucht werden, ob einige der bisher verwendeten NSAR, nämlich ASS, Diclofenac und Diflunisal zu einer Beeinflussung der Expression oben genannter Schlüsselenzyme und Transporter führen.

Hierfür wurde RNA aus den zuvor für 4h mit NSAR behandelten MelIM-Zellen isoliert und mittels RT-qPCR die relative mRNA-Expression, normalisiert auf 18S rRNA, bestimmt.

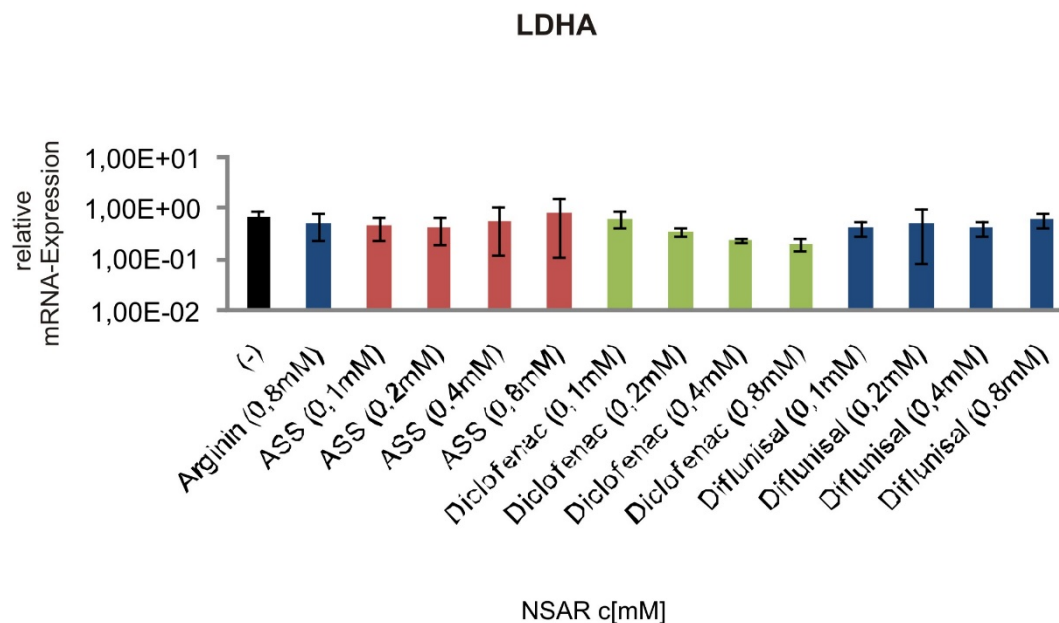


**Abbildung 4-10 mRNA-Expression des Glukose-Transporters GLUT1 in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR**

Die Expression des Glukose-Transporters GLUT1 nach Behandlung mit verschiedenen NSAR wurde in humanen MelM-Melanomzellen untersucht. Dafür wurden die Tumorzellen ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/Well) für 4h mit Diclofenac, ASS und Diflunisal in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8mM behandelt. Anschließend wurde die RNA aus den Tumorzellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Per RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung. Die Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus drei Experimenten (3 Experimente mit  $n=3$ ). Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz (-) bzw. Zellen plus Arginin) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ).

Die Expression des Glukose-Transporters GLUT1 auf molekularer Ebene konnte durch ASS kaum beeinflusst werden. Hingegen wurde durch die Zugabe von Diclofenac ab einer Konzentration von 0,2mM eine Reduktion der GLUT1-Expression erreicht. Diflunisal allerdings zeigte nur in der höchsten Konzentration (0,8mM) einen leichten Rückgang der Expression.

Die Wirkung der NSAR auf die untersuchten Untereinheiten der LDH, LDH A und B, waren mit diesen Ergebnissen vergleichbar: ASS und Diflunisal konnten die Expression der LDHA nicht wesentlich beeinflussen, während Diclofenac auch hier eine Reduktion der relativen LDHA-Expression mit steigender Konzentration bewirkte. Der Effekt war allerdings weniger deutlich als bei GLUT1.



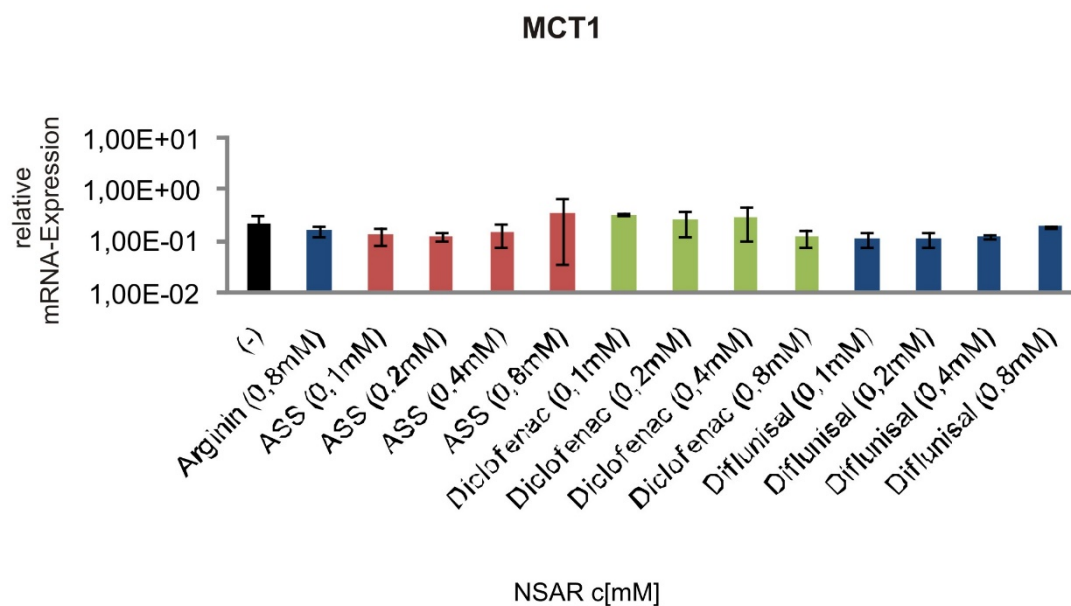
**Abbildung 4-11 mRNA-Expression der Laktatdehydrogenase A in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR**

Die Expression der Laktatdehydrogenase LDHA nach Behandlung mit verschiedenen NSAR wurde in humanen MelM-Melanomzellen untersucht. Dafür wurden die Tumorzellen ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/Well) für 4h mit Diclofenac, ASS und Diflunisal in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8mM behandelt. Anschließend wurde die RNA aus den Tumorzellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Per RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung. Die Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus drei Experimenten (3 Experimente mit  $n=3$ ). Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz (-) bzw. Zellen plus Arginin) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ).

Auch bezüglich der LDHB-Expression zeigte sich kein signifikanter Effekt (hier nicht dargestellt).

Ähnliche Ergebnisse imponierten bei Untersuchung der MCT-Expression.

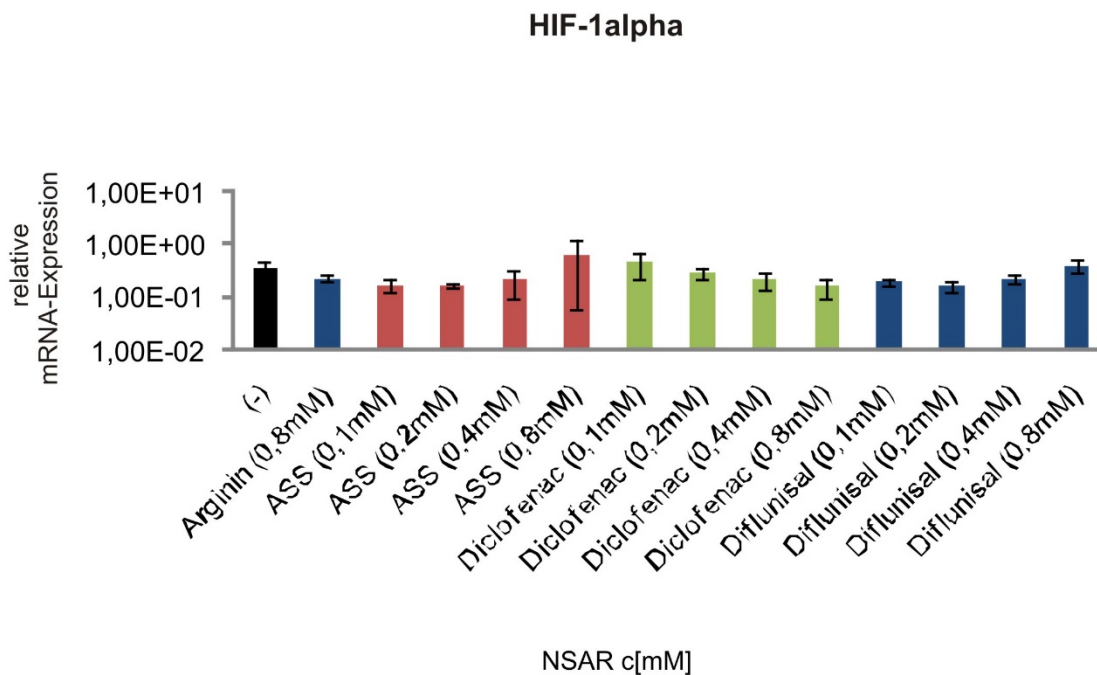
Der Monocarboxylattransporter MCT1, der für die Ausschleusung des in den Zellen anfallenden Laktats in das umgebende Milieu zuständig ist, konnte durch keine der eingesetzten Substanzen wesentlich negativ beeinflusst werden. Lediglich durch Diclofenac in der höchsten Konzentration (0,8mM) wurde eine leichte Reduktion der MCT1-Expression beobachtet.



**Abbildung 4-12 mRNA-Expression des Laktat-Transporters MCT1 in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR**

Die Expression des Monocarboxylattransporters MCT1 nach Behandlung mit verschiedenen NSAR wurde in humanen MelM-Melanomzellen untersucht. Dafür wurden die Tumorzellen ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/Well) für 4h mit Diclofenac, ASS und Diflunisal in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8mM behandelt. Anschließend wurde die RNA aus den Tumorzellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Per RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung. Die Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus drei Experimenten (3 Experimente mit  $n=3$ ). Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz (-) bzw. Zellen plus Arginin) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ).

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Genen, die am Glukosemetabolismus beteiligt sind. Durch die Inkubation von MelIM-Zellen mit verschiedenen NSAR konnte keine eindeutige Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression mit steigender Konzentration erzielt werden.



**Abbildung 4-13 mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  in humanen Melanomzellen nach Behandlung mit NSAR**

Die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  nach Behandlung mit verschiedenen NSAR wurde in humanen MelIM-Melanomzellen untersucht. Dafür wurden die Tumorzellen ( $2,5 \times 10^6$  Zellen/Well) für 4h mit Diclofenac, ASS und Diflunisal in den Konzentrationen 0,1/0,2/0,4/0,8mM behandelt. Anschließend wurde die RNA aus den Tumorzellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Per RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  STABW in logarithmischer Darstellung. Die Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus drei Experimenten (3 Experimente mit  $n=3$ ). Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz (Zellen ohne Substanz (-) bzw. Zellen plus Arginin) erfolgte mit einem ungepaarten Student's t-Test ( $p < 0,05^*$ ).

## **4.4 Quantifizierung des Sauerstoffverbrauchs humaner Tumorzelllinien nach Inkubation mit dem NSAR Diclofenac**

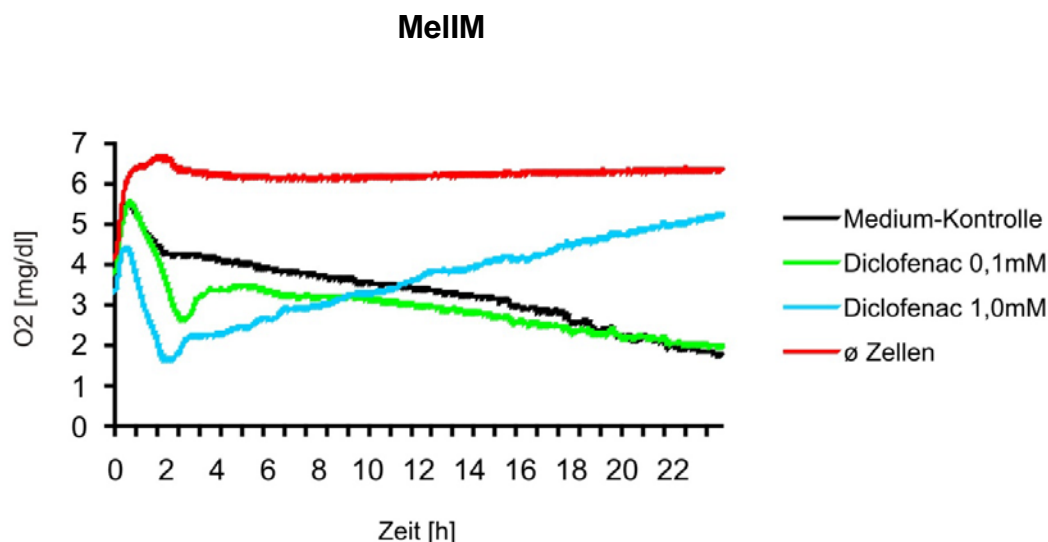
Otto Warburg postulierte in seinen Arbeiten eine gestörte Funktion der Mitochondrien als Ursache für die sogenannte „aerobe Glykolyse“ von Tumorzellen. Nach heutigem Kenntnisstand sind Tumorzellen trotz gesteigerter Glykolyse mitochondriell aktiv und decken Teile ihres Energiebedarfs durch oxidative Phosphorylierung. Daher wurde im folgenden Experiment der O<sub>2</sub>-Verbrauch von drei verschiedenen Tumorzelllinien (MelIM, U937, PC3) unter Zugabe von zwei unterschiedlichen Konzentrationen des unselektiven COX-Hemmers Diclofenac untersucht.

Dazu wurden die zuvor in RPMI-Medium kultivierten Tumor-Zellen geerntet und in OxoDish®-Platten ausgesät. Anschließend wurde Diclofenac in den Konzentrationen 0,1mM bzw. 1,0mM zugegeben. In der darauffolgenden Messung mithilfe des SDR SensorDish®-Reader wurde der O<sub>2</sub>-Verbrauch der Tumorzellen über 24 Stunden bestimmt, eine Mediumkontrolle ohne Medikamentenzusatz wurde ebenfalls mitgemessen. Außerdem ist zum Vergleich in Abb. 4-14 eine repräsentative Messung des Sauerstoffgehalts im Medium ohne Zellen dargestellt.

Abb. 4-14 macht deutlich, dass die Zelllinie MelIM stark respiratorisch aktiv ist, was anhand des Sauerstoffverbrauchs im Verlauf der Messung im Vergleich zur Medium-Kontrolle deutlich wird. Sowohl nach Zugabe der niedrigen als auch der hohen Konzentration des NSAR zeigte sich in den ersten 2h ein Peak-artiger Anstieg in der Atmungsaktivität.

Im weiteren Verlauf bewirkte eine Diclofenac-Konzentration von 0,1mM einen weiterhin hohen O<sub>2</sub>-Verbrauch der MelIM-Zellen, während es durch die Inkubation mit 1,0mM Diclofenac zu einem stark verminderten Sauerstoff-Verbrauch kam und die MelIM-Zellen ihre Atmung einstellten.

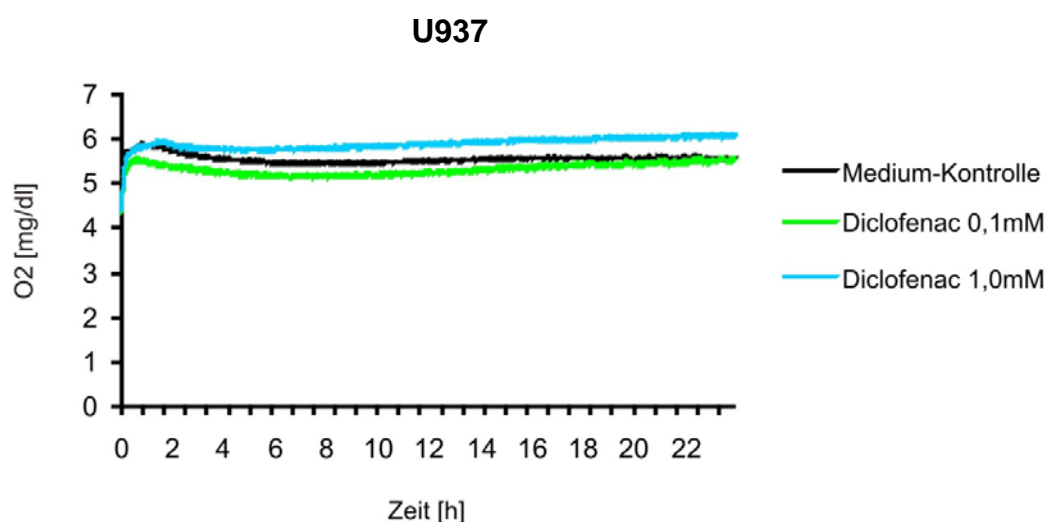




**Abbildung 4-14 Sauerstoffverbrauch während der Kultur der humanen Tumorzelllinie MellM nach Inkubation mit Diclofenac**

Es wurde der Sauerstoffverbrauch während der Kultur von Tumorzellen mit einem SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens gemessen. Die Tumorzelllinie MellM wurde als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in den 24-Well-PreSens-Platten ausgesät und mit dem NSAR Diclofenac in den Konzentrationen 0,1mM und 1,0mM behandelt. Der  $O_2$ -Verbrauch der Tumorzellen wurde über einen Zeitraum von 24h gemessen. Gezeigt ist eine repräsentative Messung aus  $n=5$  Experimenten.

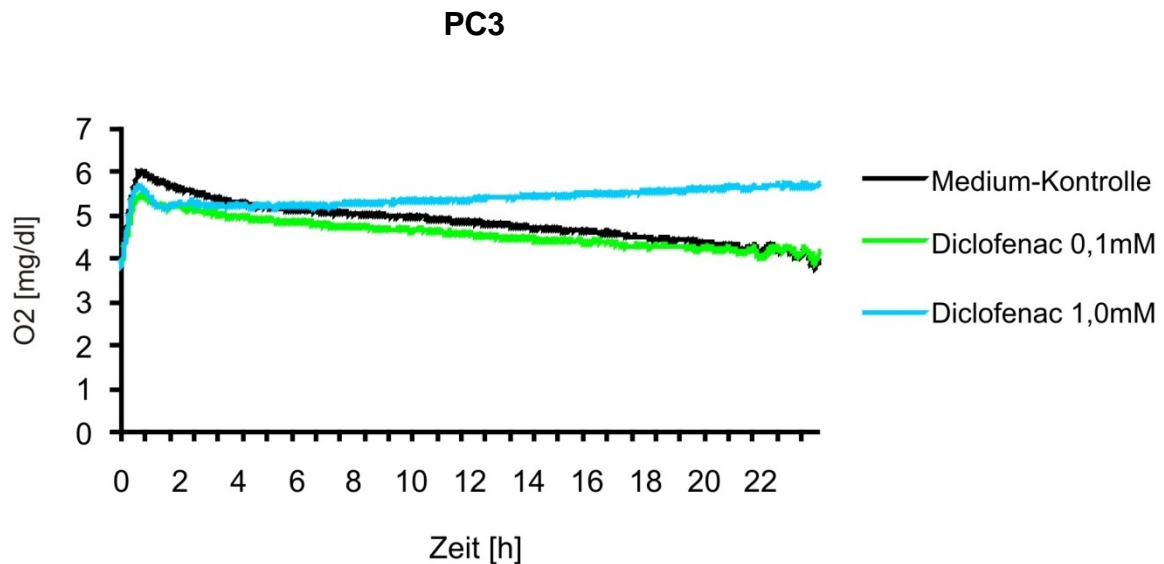
Abb. 4-15 zeigt im Vergleich, dass das Atmungsverhalten der Lymphomzelllinie U937, eine respiratorisch wenig aktive Tumorzelllinie, durch die Zugabe des NSAR Diclofenac nicht beeinflusst werden konnte.



**Abbildung 4-15 Sauerstoffverbrauch während der Kultur der humanen Tumorzelllinie U937 nach Inkubation mit Diclofenac**

Es wurde der Sauerstoffverbrauch während der Kultur von Tumorzellen mit einem SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens gemessen. Die Tumorzelllinie U937 wurde als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in den 24-Well-PreSens-Platten ausgesät und mit dem NSAR Diclofenac in den Konzentrationen 0,1mM und 1,0mM behandelt. Der  $O_2$ -Verbrauch der Tumorzellen wurde über einen Zeitraum von 24h gemessen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Weiterhin wurde die Prostatakarzinom-Zellen PC3 untersucht, die in ihrem Atmungsverhalten in einem Bereich zwischen den beiden oben aufgeführten Zelllinien MelIM und U937 liegt. In der nachfolgenden Abbildung ist wiederum eine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von Diclofenac in der hohen Konzentration 1,0mM zu erkennen.



**Abbildung 4-16 Sauerstoffverbrauch während der Kultur der humanen Tumorzelllinie PC3 nach Inkubation mit Diclofenac**

Es wurde der Sauerstoffverbrauch während der Kultur von Tumorzellen mit einem SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens gemessen. Die Tumorzelllinie PC3 wurde als Monolayer in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in den 24-Well-PreSens-Platten ausgesät und mit dem NSAR Diclofenac in den Konzentrationen 0,1mM und 1,0mM behandelt. Der  $O_2$ -Verbrauch der Tumorzellen wurde über einen Zeitraum von 24h gemessen. Gezeigt ist eines von zwei durchgeführten Experimenten.

## 5 Diskussion

### 5.1 NSAR als mögliche Inhibitoren des Tumorwachstums

Ein typisches Kennzeichen von Tumorzellen ist ihr aggressives und unkontrolliertes Wachstumsverhalten, welches in Folge zu Invasivität und Metastasierung führt<sup>[11]</sup>. Dies ist verschiedensten Veränderungen auf molekularer Ebene zuzuschreiben, wo Onkogene sowie Tumorsuppressorgene an Schlüsselstellen im Bereich von Wachstumsregulation und Metabolismus eingreifen und eine maligne Entartung bewirken<sup>[4, 5]</sup>. Der Tumormetabolismus ist auch ein möglicher Angriffspunkt für Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen. In diesem Zusammenhang wird die Rolle von NSAR seit vielen Jahren diskutiert. In dieser Arbeit sollten neben der klassischen Inhibition der Cyclooxygenase (COX) weitere Aspekte der Wirkung von NSAR auf Tumorzellen analysiert werden.

Im klinischen Alltag finden sich bereits multiple Chemotherapeutika, die genau an oben erwähntem Charakteristikum von Tumorzellen, nämlich ihrem schnellen Wachstum und ihrer hohen Teilungsrate, ansetzen<sup>[5]</sup>. Leider sind aber typische Nebenwirkungen von Chemotherapeutika genau dem geschuldet, da auch normale Körperzellen mit einer hohen Teilungsrate, wie Keimzellen, Haare und Schleimhaut, von den Medikamenten angegriffen werden. Man war und ist also bestrebt, spezifischere, möglichst ausschließlich Tumorzellen angreifende Substanzen anzuwenden.

In diesem Kontext zeigten bereits vor ca. 40 Jahren in hochkarätigen Journals publizierte Untersuchungen, dass eine regelmäßige Einnahme von NSAR, insbesondere des weltweit bekannten Aspirin®, einen gewissen protektiven Effekt im Hinblick auf die Entwicklung von Krebs ausübt<sup>[58]</sup>. Diese NSAR wären „Chemotherapeutika“ mit einer deutlich geringeren Toxizität und einem deutlich schmäleren Nebenwirkungsspektrum. In den letzten Jahren wurden mehrere Studien durchgeführt, die diese Daten in verschiedenen Tumorentitäten verifizieren konnten<sup>[80]</sup>.

### 5.1.1 Inhibition der Proliferation von malignen Melanom-Zellen durch Zugabe verschiedener NSAR *in vitro* und *in vivo*

Da das maligne Melanom aufgrund von Aggressivität und Metastasierungspotenzial zumeist mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht, wählten wir die Melanom-Zelllinie MelIM für unsere Untersuchungen. Wie bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden konnte, zeigen MelIM-Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien eine hohe Proliferationsaktivität<sup>[19]</sup>. Dies fiel auch in den hier gezeigten Experimenten auf; andere untersuchte Tumorzellen (z.B. Nierenzell-Karzinomzellen RCL 1503, Gliomzellen U87) hatten eine deutlich geringere Wachstumsgeschwindigkeit.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun am Beispiel dieser stark proliferierenden Melanomzellen eine signifikante Beeinflussung der Proliferation maligner Zellen durch nicht-selektive NSAR (Hemmung von COX-1 und -2) gezeigt werden. Wir beobachteten durch Zugabe von Diclofenac bereits in niedrigen Konzentrationen (0,2mM und 0,4mM) einen signifikanten Rückgang der Wachstumsrate. Bei den anderen Medikamenten war dieser Effekt erst in den höheren Dosen feststellbar (Diflunisal 0,8mM; Ibuprofen 1,0mM; Acetylsalicylsäure 5,0mM).

Aufbauend auf den vorliegenden Untersuchungsergebnissen wurde in unserer Forschungsgruppe auch *in vivo* ein signifikanter proliferationshemmender Effekt auf Melanomzellen (B16) durch die Zugabe von Diclofenac gesehen<sup>[37]</sup>, was auch durch andere Forscher bestätigt wurde<sup>[81]</sup>.

In weiteren Studien konnte ebenfalls durch Diclofenac, aber auch durch den Einsatz von Ibuprofen, an humanen Gliomzellen *in vitro* eine signifikante Proliferationshemmung erzielt werden<sup>[82]</sup>, dies allerdings erst nach 72 Stunden (im Gegensatz zu 24 Stunden in den vorliegenden Experimenten dieser Arbeit).

Darüber hinaus untersuchten wir in unserer Arbeitsgruppe auch das oben erwähnte NSAR Diflunisal, welches zu den älteren NSAR<sup>[83]</sup> mit einer gewissen Affinität zur COX-2-Inhibition gezählt wird und in unseren Experimenten ab einer Konzentration von 0,8mM eine signifikante Proliferationshemmung erkennen ließ. Zu diesem Medikament existiert in der Literatur leider nur eine schmale Studienlage. Interessanterweise konnte in einer aktuellen Arbeit von Shirakawa et al. sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Inhibition des Wachstums von Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (AML) durch Diflunisal erzielt werden. Diese AML-Zellen zeichnen sich

durch die Generierung eines Fusionsproteins via Chromosomentranslokation t(8;21) aus und zeigen eine Abhängigkeit vom Enzym p300 und dessen Histon-Acetyltransferase-Aktivität<sup>[83]</sup>.

Wie bereits beschrieben wurde in vielen Arbeiten der Einfluss des weltweit verbreiteten Aspirins (Acetylsalicylsäure, ASS) auf die Entwicklung von kolorektalen Tumoren analysiert. In unseren Proliferationsstudien ließ sich durch den Einsatz von ASS erst in hohen Konzentrationen von 5,0mM eine signifikante Wachstumsreduktion erzielen. In neueren Untersuchungen wurde darüber hinaus beobachtet, dass insbesondere der Zeitpunkt des Beginns der Aspirin-Therapie das Outcome der Patienten beeinflusst: so bewirkte die Einnahme des Aspirins ausschließlich nach Diagnosestellung ein verlängertes Überleben bei Patienten mit Darmkrebs. Als molekulare Grundlage dieses Effekts wurde die Down-Regulation einer mutierten Phosphatidylinositol 3-Kinase postuliert<sup>[84]</sup>.

Die in den verschiedenen Experimenten aufgefallenen substanzspezifischen Unterschiede hinsichtlich ihres inhibitorischen Effekts auf die Tumorzellen lassen vermuten, dass dieser Einfluss nicht ausschließlich auf einer Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase - als Charakteristikum dieser Medikamentengruppe - beruht. Dies wurde von mehreren Autoren, zum Teil bereits vor 20 Jahren, postuliert, welche in ihren Studien zeigten, dass eine proliferationshemmende Wirkung von NSAR sowohl in COX-exprimierenden wie auch COX-defizienten Tumorzellen erzielt wurde<sup>[48, 68, 69]</sup>. Im Umkehrschluss zeigte sich, dass trotz einer überexprimierten Cyclooxygenase kein reduziertes Wachstum von Tumorzellen, in diesem Fall aus einem Kolonkarzinom, durch einen selektiven COX-2-Hemmer verzeichnet werden konnte<sup>[67]</sup>, worauf später noch näher eingegangen wird.

### **5.1.2 Ausschluss eines tumorzellspezifischen Effekts der NSAR - Vergleich verschiedener Tumorentitäten**

Da Diclofenac bei MelM-Zellen als potenteste Substanz identifiziert wurde, inkubierten wir nun Zellen eines Nierenzellkarzinoms, Glioms, Lymphoms und Prostatakarzinoms mit diesem NSAR. Es zeigte sich eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferationsrate bei Nierenzell-, nicht aber bei Gliom-Tumorzellen. Außerdem war je nach verwendeter Tumorzelllinie die Sensitivität gegenüber Diclofenac unterschiedlich. Während bei den Nierenzellkarzinom-Zellen (RCL1503) bereits ab

einer niedrigen NSAR-Konzentration von 0,2mM eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate erreicht werden konnte, sprachen die Lymphom- und Prostatakarzinom-Zellen erst ab einer Medikamentenkonzentration von 0,4mM an. Die Gliom-Zellen ließen zwar auch einen gewissen Trend der Proliferationshemmung erkennen, ein signifikanter Effekt konnte hier aber nicht erzielt werden. Möglicherweise zeigt diese Tumorentität eine geringere Abhängigkeit von den Stoffwechselschritten und Signalkaskaden, die durch Diclofenac auf molekularer Ebene beeinflusst werden können.

Da es sich beim Gliom bzw. Glioblastom um einen besonders malignen Tumor mit schlechter Prognose handelt, finden sich in der Literatur mittlerweile einige *in vitro*-, aber auch *in vivo*-Studien zum Einfluss von NSAR, insbesondere auch zum von uns näher untersuchten Diclofenac, auf diese Tumorzellen. So konnten Chirasani et al. an murinen Gliomzellen *in vitro* eine dosisabhängige Diclofenac-vermittelte Hemmung des Zellwachstums beobachten. Dieses Resultat wurde mit nicht-toxischen Medikamentenkonzentrationen erzielt und war mit einer signifikant verminderten Laktatsekretion vergesellschaftet. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit fanden die Autoren im Rahmen einer Behandlung mit Diclofenac, allerdings *in vivo*, sogar eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums<sup>[85]</sup>.

Ein weiterer Tumor des Nervensystems ist das Neuroblastom, die häufigste Neoplasie im Kindesalter und ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert. Johnsen et al. konnten in ihren Versuchen durch den Einsatz von Diclofenac sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Neuroblastom-Xenografts eine signifikante Wachstumshemmung und vermehrtes Zellsterben induzieren<sup>[62]</sup>.

Darüber hinaus wurde in Pankreaskarzinomzellen durch Zugabe von Diclofenac *in vivo* eine verstärkte Apoptose beobachtet. Es wird ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer chronischen Pankreatitis und der Entstehung von Pankreastumoren vermutet, was den Effekt der entzündungshemmenden NSAR auf diese Tumorzellen miterklären könnte<sup>[86]</sup>.

### **5.1.3 Selektive COX-2-Inhibition - höhere Wirksamkeit in der Proliferationshemmung verschiedener Tumorzelllinien?**

In der Annahme, dass eine Inhibition der Cyclooxygenase zumindest einen gewissen Anteil an der anti-karzinogenen Wirkung der NSAR hat, stellt sich die Frage, ob dieser

Effekt nur von der Expression des Isoenzym COX-2 abhängt. Dieses ist, wie bereits beschrieben, im Gegensatz zur konstitutiv im Normalgewebe exprimierten COX-1 in Tumorgeweben hochreguliert und beeinflusst das maligne Verhalten der Tumorzellen<sup>[46, 53, 55, 56]</sup>. Da die bekannten Nebenwirkungen der unselektiven COX-Hemmer vor allem auf einer Inhibition der COX-1 zu beruhen scheinen<sup>[46, 48]</sup>, wäre ein therapeutischer Ansatz mit einem selektiven COX-2-Hemmer zu bevorzugen. Die positiven Ergebnisse, die mit dem selektiven COX-2-Inhibitor Celecoxib zu verzeichnen waren, stützten diese Hypothese und veränderten auch das Therapieregime bei Darmkrebs-Patienten<sup>[48, 55, 56]</sup>.

Da auch NS-398, ein bisher nicht im klinischen Alltag verwendeter selektiver COX-2-Hemmer, in experimentellen Studien die Invasivität verschiedener Krebsarten negativ für das Malignom beeinflusste<sup>[46, 48, 64, 65]</sup>, sollte dies im Rahmen unserer Versuche an den verschiedenen Tumorzelllinien überprüft werden. Die bereits mit den nicht-selektiven COX-Hemmern untersuchten Melanom-, Nierenzellkarzinom-, Lymphom- und Prostatakarzinomzellen wurden daher mit aufsteigenden Konzentrationen von NS-398 inkubiert und die Proliferationsrate analysiert. In vorausgehenden *in vitro*-Untersuchungen konnten Jia et al. in Kolonkarzinom-Zellen (HT-29) sowie Attiga et al. in humanen Prostata-Karzinomzellen (DU-145) bereits in deutlich niedrigeren Konzentrationen eine geringere Invasivität der Tumorzellen demonstrieren<sup>[64, 65]</sup>. Im Gegensatz hierzu konnten wir nur eine schwache Wirkung von NS-398 auf das Proliferationsverhalten der Melanom-, Prostatakarzinom- und Lymphomzellen dokumentieren. In unseren Versuchen ließ sich lediglich beim Nierenzellkarzinom in der höchsten Konzentration von 0,1mM eine signifikante Wirkung auf die Proliferation nachweisen.

Nach unseren Ergebnissen kann kein eindeutiger Vorteil einer selektiven COX-2-Hemmung im Vergleich zum Einsatz von unselektiven „klassischen“ NSAR bezüglich Wachstumshemmung von Tumorzellen *in vitro* angenommen werden. Allerdings wurde in dieser Arbeit nur ein Vertreter aus der Gruppe der selektiven COX-2-Hemmer analysiert, so dass keine pauschale Aussage möglich ist. Weiterhin handelte es sich um *in vitro*-Experimente, in denen die Vorteile dieser Medikamentengruppe insbesondere in Hinsicht auf ihr günstigeres Nebenwirkungsprofil nicht abgebildet werden konnten.

Zugegebenermaßen finden sich aber auch in der Literatur Studien, die zwar einen wachstumshemmenden Effekt von NS-398 sowie des verwandten Celecoxib

darstellen konnten, aber nicht im Zusammenhang mit einer Inhibition der COX-2<sup>[48, 67]</sup>. Somit stellt sich auch hier erneut die Frage nach anderen therapeutischen *Targets* der NSAR zusätzlich zu der bereits eingehend untersuchten und bekannten Cyclooxygenase.

Es drängt sich sowohl in der Literatur als auch in unseren Versuchen die Annahme auf, dass weitere, COX-unabhängige Mechanismen für die anti-proliferative Wirkung von NSAR auf Tumorzellen verantwortlich sein müssen. Da Tumore als schnell proliferierendes Gewebe auf eine rasche Bereitstellung einer suffizienten Menge an Nährstoffen, insbesondere Glukose, angewiesen sind, ist die Antwort möglicherweise im Bereich dieses Stoffwechselweges zu suchen. Diese Abhängigkeit von Tumorzellen hatte bereits Otto Warburg in seiner Arbeit über die sogenannte „aerobe Glykolyse“ von Tumoren dargelegt: er, und nach ihm viele weitere Forscher, konnten eine gesteigerte Glukoseutilisation von malignen Zellen, auch unter aeroben Bedingungen, nachweisen<sup>[4, 11, 12, 16, 30]</sup>. Der Einfluss von NSAR auf den Glukosemetabolismus im Tumor wurde daher in dieser Arbeit analysiert.

## **5.2 Der alterierte Glukosemetabolismus als potentiell therapeutisches *Target* für NSAR am Beispiel von malignen Melanom-Zellen**

Verschiedene Studien zeigen eine Hochregulation der an der Glykolyse beteiligten Enzyme und Transporter in Tumorzellen<sup>[4, 17, 19, 22, 23]</sup>. Wir analysierten in malignen Melanom-Zellen, ob die Expression bestimmter Glykolyse-assoziiierter Gene durch verschiedene NSAR negativ reguliert wird. Verwendet wurden Aspirin (ASS), als im klinischen Alltag häufig eingesetztes Medikament, Diclofenac, aufgrund seiner potenten Eigenschaften in den vorhergehenden Experimenten, sowie Diflunisal.

### **5.2.1 GLUT1**

Durch den membranständigen Glukosetransporter GLUT1 stellen die Tumorzellen eine ausreichende Glukose-Aufnahme sicher. Die Überexpression von GLUT1 ist in vielen Tumoren, u.a. Mamma- und Ovarialkarzinom sowie im Glioblastom, mit einer schlechteren Überlebensrate der Patienten assoziiert<sup>[4]</sup>. Eine Beeinflussung der Expression via NSAR wäre also von großem therapeutischem Interesse: eine pharmakologische Inhibition dieses Transporters sowie auch weiterer essentieller



glykolytischer *Targets* (LDHA, MCT1, siehe unten) sollte für die Tumorzellen mit einer reduzierten Energiegewinnung via Glykolyse und somit einem reduzierten Wachstum einhergehen<sup>[87]</sup>.

Auf molekularer Ebene ließ sich aber in unseren Experimenten durch die Zugabe von Aspirin (ASS) die GLUT1-Expression in keiner der eingesetzten Konzentrationen beeinflussen. Die postulierte anti-kanzerogene Wirkung dieses Medikamentes<sup>[58]</sup> scheint somit auf anderen Mechanismen zu beruhen.

Diclofenac hatte den eindrucklichsten Effekt mit einer konzentrationsabhängigen Inhibition der GLUT1-Expression, beginnend bei einer eingesetzten Medikamenten-Konzentration von 0,2mM. Bei der Inkubation mit Diflunisal zeigte sich eine ähnliche Tendenz, allerdings erst ab der höchsten eingesetzten NSAR-Konzentration von 0,8mM.

Parallel dazu quantifizierten wir photometrisch die Menge an extrazellulärer Glukose nach Inkubation der Melanom-Zellen mit steigenden Konzentrationen an Aspirin, Diclofenac, Diflunisal und Ibuprofen. Bei allen vier Medikamenten kam es zu einer Zunahme der Glukosekonzentration im Kulturmedium mit ansteigender NSAR-Konzentration. Dies deutet darauf hin, dass diese Medikamente konzentrationsabhängig eine verringerte Glukoseaufnahme in die Tumorzellen bewirken.

Wie auch schon in den Proliferationsstudien war ein substanzspezifischer Unterschied in der Wirksamkeit der einzelnen NSAR zu erkennen. Die verschiedenen Vertreter dieser Medikamentenklasse bewirken vermutlich über unterschiedliche Mechanismen eine mehr oder weniger ausgeprägte Inhibition der Proliferation und bedingen so einen geringeren Glukosebedarf für diese dann weniger stark wachsenden Tumorzellen.

In weiteren Analysen wurde nun anschließend die Glukose-Verstoffwechselung untersucht.

### 5.2.2 LDHA

Ein wichtiger Stoffwechselschritt der Glykolyse ist die enzymatische Umwandlung von Pyruvat zu Laktat<sup>[5]</sup> durch die Laktatdehydrogenase A, eine Untereinheit der LDH. Das hierfür kodierende Gen (LDHA) ist ebenfalls in vielen Malignomen hochreguliert<sup>[4, 87, 88]</sup> und mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert<sup>[13, 87]</sup>. Aufgrund dessen wäre ein pharmakologischer Angriff an diesem Schlüsselgen bzw. -enzym von hohem therapeutischem Nutzen.

Analog zu den oben erörterten GLUT1-Versuchen konnten wir eine konzentrationsabhängige Reduktion der LDHA-Expression (auf mRNA-Ebene) nach Zugabe des NSAR Diclofenac in den malignen Melanom-Zellen verzeichnen. Die Wirkung war allerdings weniger ausgeprägt und ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zur Regulation der GLUT1-Expression. Dagegen zeigten die anderen beiden NSAR (Aspirin, Diflunisal) keinen Einfluss auf die LDHA-Expression.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen auf mRNA-Ebene wurde durch alle vier eingesetzten NSAR (Ibuprofen, Aspirin, Diclofenac, Diflunisal) eine konzentrationsabhängige Reduktion der Laktatkonzentration im extrazellulären Medium erzielt. Durch den Einsatz von Diclofenac - analog zu den bisher durchgeführten Experimenten - wurde der stärkste Effekt beobachtet, da bereits ab der niedrigsten eingesetzten Konzentration (0,1mM) eine hoch signifikante Laktatreduktion nachzuweisen war.

Dieser Effekt der Medikamente könnte bei höheren NSAR-Konzentrationen damit zusammenhängen, dass durch die verminderte Proliferation der Tumorzellen eine reduzierte glykolytische Aktivität auftritt, wodurch die Laktatproduktion der Tumorzellen gehemmt wird. Denkbar wäre darüber hinaus ein synergistischer Effekt von reduzierter Glukose-Aufnahme aufgrund inhibierter GLUT-Transporter (oben dargestellt) und somit erniedrigtem Substrat-Angebot einerseits und reduzierter Laktat-Produktion durch eine Hemmung der Laktatdehydrogenase andererseits.

Interessanterweise ließ sich der Glukosemetabolismus, insbesondere die extrazelluläre Laktatmenge, bereits bei niedrigeren NSAR-Konzentrationen beeinflussen als das Proliferationsverhalten der Tumorzellen. Für dessen Inhibition waren höhere Medikamentenmengen notwendig. Dies scheint darauf zurückzuführen zu sein, dass Diclofenac bereits bei niedrigen Konzentrationen die Glykolyse und den Export von Laktat hemmt, aber die Tumorzelle aufgrund persistierender respiratorischer Aktivität trotzdem weiterwachsen kann. Bei höheren Konzentrationen wird zusätzlich die Atmung blockiert, somit ist es der Zelle nicht mehr möglich, Energie zu generieren und zu wachsen.

Übereinstimmend mit der vorhandenen Literatur<sup>[14]</sup> konnte auch unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das von Tumorzellen exportierte Laktat in keinem Fall nur als „Abfallprodukt“ einer Stoffwechselreaktion zu sehen ist. Vielmehr scheint es einen immunmodulierenden Effekt zu haben<sup>[33, 34, 87]</sup> und macht den Tumor somit weniger angreifbar für das körpereigene Abwehrsystem. Weiterhin gehen hohe Laktatmengen

offenbar auch mit einem reduzierten Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie einher<sup>[30]</sup>. In Zusammenschau aller Ergebnisse gewinnt eine pharmakologische Beeinflussung dieses Stoffwechselschritts an zunehmender therapeutischer Bedeutung. Auch ein potentieller Nutzen der LDHA als prognostischer Marker<sup>[13]</sup> wurde bereits postuliert. In diesem Zusammenhang gibt es Meinungen, die analog zur „klassischen“ PET-Diagnostik eine Bildgebung, die sich eine Laktat-Markierung zu Nutze macht, als vielversprechendes Prognose-Tool sehen<sup>[32]</sup>.

### 5.2.3 LDHB

Die in den meisten malignen Tumoren vorherrschende und überexprimierte Isoform des Enzyms Laktatdehydrogenase ist die LDH-5<sup>[88]</sup>, welche aus vier LDHA-Untereinheiten gebildet wird<sup>[23]</sup>. Dies geht konform mit Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zur Hochregulation der LDHA in Tumorzellen auf mRNA-Ebene<sup>[19]</sup>. In normalem Gewebe, aber auch in malignen Zellen, findet sich aber auch eine Expression des Isoenzyms LDH-1, bestehend aus vier LDHB-Untereinheiten, das laut Literatur bevorzugt die Rückreaktion von Laktat zu Pyruvat katalysiert<sup>[88, 89]</sup>.

In unseren Experimenten konnten wir eine Persistenz der respiratorischen Aktivität trotz erhöhter Glykolyse in Tumorzellen feststellen (siehe unten, Punkt 5.3). Dies geht auch mit aktuelleren Studienergebnissen aus Experimenten mit Pankreaskarzinom-Zellen konform<sup>[90]</sup>. Möglicherweise wird also ein gewisser Anteil an Laktat via LDH-1 (kodiert von LDHB) im Tumor zu Pyruvat rück-verstoffwechselt und der Atmungskette in den Mitochondrien zugeführt. Interessanterweise kam es in unseren Versuchen durch NSAR zu keiner signifikanten negativen Beeinflussung der LDHB auf mRNA-Ebene. Darüber hinaus imponierte teilweise sogar eine gesteigerte Expression der LDHB. Dies könnte womöglich von therapeutischem Nutzen sein: Arora et al. konnten in einer neueren Studie einen Zusammenhang zwischen überexprimierter LDHB und verstärkter Apoptose und reduzierter Zellmigration in Brustkrebszellen beobachten<sup>[88]</sup>. Im Gegensatz hierzu existieren in der Literatur aber auch Studien, die eine Korrelation zwischen einer erhöhten LDHB-Expression und schlechterer Überlebensrate in Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge<sup>[91]</sup> sowie einem schlechteren Therapieansprechen und reduzierter Überlebenszeit bei Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom beobachteten<sup>[92]</sup>.

Weiterhin ist anscheinend vor allem das Verhältnis der zwei Unterformen, LDHA und B, zueinander von prognostischer Wichtigkeit: man postulierte einen „glykolytischen

Index“, die sogenannte *LDH-B/LDH-A Ratio*, als Biomarker im Hinblick auf die Tumoraggressivität am Beispiel von Brustkrebszellen<sup>[88]</sup>.

Zusammenfassend scheint die Rolle der Isoform LDHB in der Karzinogenese und Tumorthherapie noch nicht abschließend geklärt.

#### 5.2.4 MCT1

Unter Umständen ist die beobachtete reduzierte Laktatkonzentration im Tumorzellüberstand nicht nur auf eine Inhibition der Laktatproduktion zurückzuführen, sondern auch durch eine verminderte Ausschleusung des Laktats via Monocarboxylattransporter (v.a. MCT1) bedingt. Es existieren bereits seit längerem Untersuchungen, die einen verminderten Laktattransport über die Tumorzellmembran aufgrund einer Blockade der MCT beobachteten. Dies führt konsekutiv zu einer intrazellulären Laktatakkumulation und letztendlich zum Zelltod<sup>[74]</sup>. Auch die für unsere Arbeit wichtigen NSAR scheinen einen inhibierenden Einfluss auf diese MCTs zu haben<sup>[72, 73]</sup>. In unseren Experimenten wurde nur in der höchsten eingesetzten Diclofenac-Menge von 0,8mM eine leichte Reduktion der mRNA-Expression von MCT1 nachgewiesen; Diflunisal und Aspirin hingegen zeigten keinen inhibierenden Effekt bzw. führten in der höchsten Konzentration (0,8mM) sogar zu einem Anstieg der mRNA-Expression.

Unabhängig von der Hemmung der Expression zeigen nun neue, weitergehende Untersuchungen einer japanischen Forschergruppe, dass NSAR, und vor allem Diclofenac, die Monocarboxylattransporter nicht-kompetitiv blockieren und somit den Laktattransport stören. Insbesondere scheint die intrazelluläre Aufnahme des Laktats via MCT4 gehemmt zu sein<sup>[93]</sup>. Dies wird parallel dazu aktuell auch in unserer Arbeitsgruppe untersucht.

Die Blockade der MCTs auf Tumorzellen stellt einen interessanten therapeutischen Ansatz dar<sup>[87]</sup>. Hierdurch ließe sich zusätzlich das extrazelluläre Laktat im Tumormilieu reduzieren und somit die Prognose von Tumorpatienten wesentlich beeinflussen: die Neoangiogenese wäre reduziert und mit ihr das invasive Wachstum und Metastasenbildung der malignen Zellen. Weiterhin könnte dies zu einer besseren Aktivität von Immunzellen im Tumormilieu führen und eine Anti-Tumorantwort ermöglichen. Die neoplastischen Zellen wären außerdem sensibler gegenüber einem externen Angriff mit Bestrahlung und Chemotherapie.

### 5.2.5 HIF-1alpha

Eine zentrale Rolle im alterierten Glukosemetabolismus spielt bekanntermaßen der Transkriptionsfaktor HIF-1, bzw. seine Untereinheit HIF-1alpha. Dieser im hypoxischen Milieu der Tumorzellen stabilisierte und hochregulierte Faktor bewirkt wiederum eine verstärkte Expression von glykolytischen Enzymen und unterhält somit die „aerobe Glykolyse“ im Malignom<sup>[4, 22]</sup>. Sowohl selektive als auch unselektive NSAR sind in der Lage, diesen Transkriptionsfaktor in Tumorzellen zu hemmen<sup>[69, 70]</sup>.

Es stellte sich nun die Frage, ob die in unseren Experimenten wie auch in anderen Studien zu beobachtende konzentrationsabhängige Reduktion der mRNA-Expression von glykolytischen Enzymen durch eine direkte NSAR-Wirkung auf die jeweiligen Gene (u.a. GLUT1, LDHA) bedingt ist oder indirekt über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors HIF-1alpha. Inkubation mit Diclofenac bewirkte eine leichte, jedoch nicht statistisch signifikante Inhibition von HIF-1alpha. Durch die anderen NSAR, Diflunisal und ASS, wurde tendenziell ein gegenteiliger Effekt erzielt, d.h. es kam sogar zu einer erhöhten Expression von HIF-1alpha. Nach unseren Ergebnissen ist also eine HIF-unabhängige Regulation der glykolytischen Enzyme durch NSAR anzunehmen.

Wie bereits in der Einleitung angedeutet konnten im Vergleich hierzu Palayoor et al. in Prostatakarzinom-Zellen durch die unselektiven NSAR Diclofenac und Ibuprofen eine Reduktion sowohl von HIF-1alpha auf Proteinebene als auch, möglicherweise indirekt über die Inhibition von HIF-1alpha, der hiervon regulierten Gene und Proteine VEGF und GLUT1 beobachten. Dieser Effekt war sowohl in COX-2-exprimierenden als auch -defizienten Tumorzellen zu verzeichnen, was wiederum COX-unabhängige Mechanismen der HIF-Inhibition vermuten lässt<sup>[69]</sup>.

Damit konform inkubierten auch andere Autoren die gleiche COX-2-exprimierende Prostatakarzinom-Zelllinie (PC3), die auch in unseren Proliferations- und Laktatmessungen verwendet wurde, sowie eine COX-2-negative Kolonkarzinomzelllinie (HCT116) mit dem selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 und konnten in beiden Zelllinien eine reduzierte HIF-1alpha-mRNA-Expression sowie auch eine Reduktion auf Proteinebene detektieren<sup>[70]</sup>.

## 5.3 Untersuchung der Atmungsaktivität verschiedener Tumorzellen in Abhängigkeit von der Zugabe von NSAR

Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts entdeckte der deutsche Wissenschaftler Warburg die sogenannte „aerobe Glykolyse“ von malignen Tumorzellen. Er bezeichnete damit die Beobachtung, dass die transformierten Zellen trotz eines ausreichenden Sauerstoffangebotes eine große Menge Glukose zur Deckung ihres ATP-Bedarfs durch die Glykolyse schleusten und konsekutiv hohe Konzentrationen von Laktat als „Abfallprodukt“ dieser biochemischen Stoffwechselreaktion im Tumormilieu zu messen waren. Seine Vermutung legte diesem Effekt eine gestörte Mitochondrienfunktion zugrunde<sup>[12]</sup>. Obwohl die Beobachtung der verstärkten Glykolyse in der Zwischenzeit allgemein anerkannt ist, scheint dies nicht auf einer gestörten Mitochondrienfunktion zu beruhen, da viele Tumorzellen durchaus in der Lage sind, ihre Energie auch über die oxidative Phosphorylierung zu generieren.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass z.B. die Melanom-Zelllinie MelIM eine hohe respiratorische Aktivität aufweist, während die Prostatakarzinom-Linie und die Lymphomzellen weniger Atmungsaktivität zeigen. Somit scheinen die Tumorzellen trotz Adaptation ihres Stoffwechsels in unterschiedlicher Ausprägung weiterhin Zellatmung durchzuführen, die Mitochondrien müssen also nach wie vor in der Lage sein, ihrer Funktion nachzukommen. Parallel dazu ließ sich aber in allen drei untersuchten Zelllinien, unabhängig von ihrer respiratorischen Aktivität, eine hohe Konzentration von Laktat als Endprodukt der Glykolyse im extrazellulären Medium nachweisen. Dass dieses Laktat nicht wie initial angenommen als nutzloser „Abfall“ anzusehen ist, sondern eine für den Tumor essentielle Rolle im Hinblick auf Überleben und Immunmodulation mit sich bringt, wurde bereits erörtert.

Es ist nun also zu vermuten, dass die neoplastischen Zellen sich nicht nur auf die „aerobe Glykolyse“ zur Generierung ihrer Energieäquivalente verlassen, sondern zeitgleich weiterhin oxidative Energiegewinnung fortführen. Entsprechend zeigen neuere Arbeiten<sup>[90]</sup>, dass z. B. Tumorzellen im Pankreaskarzinom eine hohe mitochondriale Aktivität und Abhängigkeit von oxidativer Phosphorylierung aufweisen. Eine therapeutische Strategie, die beide Wege in Tumorzellen inhibieren kann, wäre also ideal.

Bei den Melanom-Zellen MeIM war durch die Zugabe des NSAR Diclofenac, welches in den Proliferationsexperimenten die stärkste inhibierende Wirkung auf diese Zelllinie gezeigt hatte, nach Kurzzeitexposition sowohl in hoher als auch niedriger Konzentration eine gesteigerte Respiration zu verzeichnen. Dies könnte bedeuten, dass die Glykolyse der Melanomzellen durch Diclofenac so effektiv unterdrückt wird, dass ein Wechsel auf die oxidative Phosphorylierung notwendig wird.

Im weiteren Verlauf zeigte sich in den Zellen, welche mit der niedrigeren Diclofenac-Konzentration (0,1mM) behandelt worden waren, weiterhin eine verstärkte Atmungsaktivität. Dagegen war bei der höheren NSAR-Konzentration (1,0mM) nach ca. zweistündiger Inkubationszeit ein konsekutiver Anstieg des O<sub>2</sub>-Gehaltes im Zellüberstand feststellbar, d.h. die Atmung wurde gehemmt. Diclofenac inhibiert in dieser Konzentration nun sowohl die „aerobe Glykolyse“ als auch die Respiration der Melanomzellen. Mikroskopisch waren entsprechend vermehrt tote Zellen nachweisbar.

Im Gegensatz zu den Melanomzellen wurden die nur gering respiratorisch aktiven Lymphomzellen weder in der niedrigen noch in der hohen Diclofenac-Konzentration in ihrem Atmungsverhalten gestört. Die Atmung der Prostatakarzinom-Zellen wurde zwar ebenfalls durch Diclofenac beeinflusst, allerdings deutlich geringer ausgeprägt als bei den Melanomzellen. Offensichtlich sind die beobachteten Effekte des NSAR Diclofenac auf die Atmungsaktivität zellspezifisch und scheinen eine gewisse Menge an Grund-Respiration vorauszusetzen. Die bereits oben diskutierte Wirkung auf die Glykolyse erscheint homogener auf unterschiedliche Tumorentitäten anwendbar.

## 5.4 Ausblick

Um die in vorliegender Arbeit erzielten Ergebnisse im klinischen Alltag umsetzen zu können, sind noch weitere Studien, insbesondere *in vivo*, notwendig. Erste Analysen mit Melanom- und Gliomzellen zeigten, wie bereits erwähnt, in Maustumor-Modellen, dass Diclofenac auch *in vivo* dazu in der Lage ist das Tumorwachstum zu inhibieren<sup>[37, 85]</sup>. Allerdings müssen beim Einsatz von NSAR im Patienten auch die möglichen Nebenwirkungen berücksichtigt werden. Hierbei ist nicht nur die gastrointestinale Toxizität mit dem vermehrten Auftreten von Ulzera im Magen-Darm-Trakt, sondern auch die Niereninsuffizienz zu nennen. Tumorpatienten weisen häufig ein fortgeschrittenes Alter und gewisse Komorbiditäten auf, sodass eine längerfristige

NSAR-Einnahme, welche ja offensichtlich für den chemopräventiven bzw. anti-karzinogenen Effekt notwendig scheint, nicht ohne Bedenken zu empfehlen ist.

Auch die Inhibition der molekularen *Targets* innerhalb der normalen Körperzellen kann mit unerwünschten Wirkungen einhergehen. Da ein genetisch bedingter Verlust des LDHA-Proteins nur eine milde anstrengungsabhängige Myopathie zu bewirken scheint, werden einige Vertreter der LDHA-Inhibitoren in der onkologischen Forschung als therapeutischer Ansatzpunkt näher untersucht<sup>[87]</sup>.

Bisher findet sich nur eine limitierte Anzahl an Studiendaten zum Einsatz von NSAR, insbesondere auch Diclofenac, als explizite Anti-Tumor-Therapie, im Gegensatz zur Verwendung als Analgetikum oder Antiphlogistikum<sup>[81]</sup>. Wenige retrospektive Analysen beobachteten einen Überlebensvorteil in Brustkrebspatientinnen durch den intraoperativen Einsatz der NSAR Ketorolac und Diclofenac<sup>[94]</sup>. Auch Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom mit präoperativer Diclofenac-Therapie zeigten statistisch signifikant weniger Fernmetastasierung<sup>[95]</sup>.

Um eindeutige therapeutische Empfehlungen abgeben zu können, ist allerdings die Durchführung weiterer klinischer Studien notwendig. Aktuell wird unter anderem der Effekt von topischem Diclofenac-Gel auf Laktatproduktion und Tumormetabolismus bei Patienten mit aktinischer Keratose untersucht<sup>[81]</sup>. Wie bereits eingangs erwähnt, scheint vor allem auch der „adjuvante“ Einsatz von NSAR in der Krebstherapie vielversprechend, nämlich als Kombination mit Chemotherapie, Bestrahlung und Operation (siehe oben). Diclofenac wird in neuen Studien als Bestandteil von TL-118, einer anti-angiogenetischen Medikamentenkombination aus Cimetidin, niedrig dosiertem Cyclophosphamid und Sulfasalazin in multizentrischen Studien bei metastasiertem Pankreas- und Prostatakarzinom eingesetzt<sup>[81]</sup>.



## 6 Zusammenfassung

Es hatte sich im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt, dass NSAR auch COX-unabhängige Effekte zu haben scheinen. Aufgrund dessen wurden verschiedene NSAR mit unterschiedlicher COX-Selektivität (COX-1/ COX-2) an Tumorzelllinien getestet.

Es konnte bestätigt werden, dass diese Substanzen in mehr oder weniger starkem Ausmaß auf die verschiedenen Tumorzellen wirken. Allerdings ließen sich deutliche substanzspezifische Unterschiede innerhalb der verschiedenen NSAR beobachten, vor allem auch im Hinblick auf die erforderliche Medikamentenkonzentration zur Erzielung eines inhibitorischen Effekts. Dies lässt zusätzlich auf ein COX-unabhängiges Phänomen schließen.

Die Annahme, dass NSAR ihre inhibitorische Wirkung auf Malignome unter anderem über eine Beeinflussung des Tumorzellstoffwechsels, und hier insbesondere im Bereich des Glukosemetabolismus, entfalten, ließ sich vor allem beim NSAR Diclofenac verifizieren. Bei dieser Substanz waren bereits unabhängig von einer veränderten Proliferationsrate Effekte auf die Laktatsekretion bzw. Glukose-Verstoffwechselung zu verzeichnen. Hingegen kam es bei den weiteren untersuchten Medikamenten zuerst zu einer Reduktion der Proliferation der Tumorzellen. Erst anschließend waren auch verminderte Laktatmengen messbar. Dies lässt vermuten, dass dieser Effekt möglicherweise der verminderten Gesamtzahl an vitalen Tumorzellen geschuldet ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das lang bekannte und häufig im klinischen Alltag als Analgetikum eingesetzte NSAR Diclofenac neben seiner klassischen Aktivität als Hemmer der Cyclooxygenase offensichtlich auch ein glykolytischer Inhibitor zu sein scheint. Diese Beobachtung konnte auch bereits durch unsere Arbeitsgruppe publiziert werden.

Aufbauend auf dieser Erkenntnis, die zum weiteren Verständnis der Wirkweise dieser Medikamente auf den Tumorzellmetabolismus beiträgt, lassen die anhaltend laufenden Forschungen möglicherweise in der Zukunft diese Pharmaka routinemäßige Verwendung in der etablierten Therapie von Krebspatienten finden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Rothwell, P.M., et al., *Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials*. The Lancet, 2012. **379**(9826): p. 1591-1601.
2. www.destatis.de.
3. www.rki.de.
4. Airley, R.E. and A. Mobasher, *Hypoxic Regulation of Glucose Transport, Anaerobic Metabolism and Angiogenesis in Cancer: Novel Pathways and Targets for Anticancer Therapeutics*. Chemotherapy, 2007. **53**(4): p. 233-256.
5. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage ed. 2003: Springer-Verlag.
6. Shiff, S.J. and B. Rigas, *The Role of Cyclooxygenase Inhibition in the Antineoplastic Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (Nsaids)*. The Journal of Experimental Medicine, 1999. **190**(4): p. 445-450.
7. [http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/1999/161/html/Abb%201\\_1.gif](http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/1999/161/html/Abb%201_1.gif).
8. Kandioler, D., et al., *Carcinogen-specific mutations in the p53 tumor suppressor gene in lung cancer*. Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1994. **107**(4): p. 1095-1098.
9. Kandioler-Eckersberger, D., et al., *TP53 Mutation and p53 Overexpression for Prediction of Response to Neoadjuvant Treatment in Breast Cancer Patients*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(1): p. 50-56.
10. Yun, J., et al., *Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells*. Science (New York, N.Y.), 2009. **325**(5947): p. 1555.
11. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-899.
12. Warburg, O., *[On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy.]*. Munchener medizinische Wochenschrift (1950), 1961. **103**: p. 2504-2506.
13. Girgis, H., et al., *Lactate Dehydrogenase A is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma*. Molecular Cancer, 2014. **13**: p. 101-101.
14. Choi, S.Y.C., et al., *Cancer-generated lactic acid: a regulatory, immunosuppressive metabolite?* The Journal of Pathology, 2013. **230**(4): p. 350-355.
15. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science (New York, N.Y.), 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
16. Tennant, D.A., R.V. Duran, and E. Gottlieb, *Targeting metabolic transformation for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 267-277.
17. Walenta, S. and W.F. Mueller-Klieser, *Lactate: mirror and motor of tumor malignancy*. Seminars in Radiation Oncology, 2004. **14**(3): p. 267-274.
18. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. **25**(34): p. 4633-4646.
19. Kastenberger, M., *Analyse und Modulation des Tumormetabolismus in humanen Tumorzelllinien und Tumorgewebe*. 2012.
20. Bates, S.E., *Reinventing Cancer Cell Metabolism*. Clinical Cancer Research, 2012. **18**(20): p. 5536-5536.
21. Levine, A.J. and A.M. Puzio-Kuter, *The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1340-1344.
22. Dang, C.V. and G.L. Semenza, *Oncogenic alterations of metabolism*. Trends in Biochemical Sciences, 1999. **24**(2): p. 68-72.
23. Koukourakis, M.I., et al., *Serum and Tissue LDH Levels in Patients with Breast/Gynaecological Cancer and Benign Diseases*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2009. **67**(3): p. 162-168.

24. Colegio, O.R., et al., *Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid*. Nature, 2014. **513**(7519): p. 559-63.
25. Jones, M.K., et al., *Von Hippel-Lindau tumor suppressor and HIF-1a: new targets of NSAID inhibition of hypoxia-induced angiogenesis*. The FASEB Journal, 2001.
26. Semenza, G.L., *HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2007. **39**(3): p. 231-234.
27. Matoba, S., et al., *p53 Regulates Mitochondrial Respiration*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1650-1653.
28. Dang, C.V., A. Le, and P. Gao, *MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(21): p. 6479-6483.
29. Le, A., et al., *Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(5): p. 2037-2042.
30. Hirschhaeuser, F., U.G. Sattler, and W. Mueller-Klieser, *Lactate: a metabolic key player in cancer*. Cancer research, 2011. **71**(22): p. 6921-6925.
31. Ruiz Hernandez, G., Y.A.C. Romero de Avila, and J.L. Carreras Delgado, *The value of 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (18F-FDG PET) in diagnosis of neoplastic diseases*. Med Clin (Barc), 2005. **124**(6): p. 229-36.
32. Walenta, S., et al., *Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis*. The American Journal of Pathology, 1997. **150**(2): p. 409-415.
33. Brand, A., et al., *LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells*. Cell Metabolism, 2016. **24**(5): p. 657-671.
34. Fischer, K., et al., *Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3812-9.
35. Gottfried, E., et al., *Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2013-2021.
36. Cay, O., et al., *Inhibitory Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Liver Tumor Growth in Rats*. Cancer Research, 1992. **52**(20): p. 5794-5796.
37. Gottfried, E., et al., *New Aspects of an Old Drug - Diclofenac Targets MYC and Glucose Metabolism in Tumor Cells*. PLoS ONE, 2013. **8**(7): p. e66987.
38. Zhang, Z.-J., et al., *Reduced Risk of Colorectal Cancer With Metformin Therapy in Patients With Type 2 Diabetes*. A meta-analysis, 2011. **34**(10): p. 2323-2328.
39. Miskimins, W.K., et al., *Synergistic Anti-Cancer Effect of Phenformin and Oxamate*. PLoS One, 2014. **9**(1).
40. Dart, A., *Tumour metabolism: Lactic acid: not just a waste product?* Nat Rev Cancer, 2016. **16**(11): p. 676-677.
41. Albini, A. and M.B. Sporn, *The tumour microenvironment as a target for chemoprevention*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(2): p. 139-147.
42. Rigas, B. and S.J. Shiff, *Is inhibition of cyclooxygenase required for the chemopreventive effect of NSAIDs in colon cancer? A model reconciling the current contradiction*. Medical Hypotheses, 2000. **54**(2): p. 210-215.
43. Warner, T.D. and J.A. Mitchell, *Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic*. The FASEB Journal, 2004. **18**(7): p. 790-804.
44. Ricciotti, E. and G.A. FitzGerald, *Prostaglandins and Inflammation*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2011. **31**(5): p. 986-1000.
45. Punchard, N.A., C.J. Whelan, and I. Adcock, *The Journal of Inflammation*. Journal of Inflammation, 2004. **1**(1): p. 1.
46. Cha, Y.I. and R.N. DuBois, *NSAIDs and Cancer Prevention: Targets Downstream of COX-2*. Annual Review of Medicine, 2007. **58**(1): p. 239-252.
47. Rao, A.K., *The tale of two COXs*. Blood, 2010. **115**(5): p. 921-922.
48. Thun, M.J., S.J. Henley, and C. Patrono, *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues*. Journal of the National Cancer Institute, 2002. **94**(4): p. 252-266.

49. Péez-Gutthann, S., et al., *Low-Dose Diclofenac, Naproxen, and Ibuprofen Cohort Study*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 1999. **19**(7): p. 854-859.
50. Eberhart, C.E., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1183-1188.
51. Prescott, S.M., *Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer?* Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(11): p. 1511-1513.
52. Buttar, N.S., et al., *The Effect of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition in Barrett's Esophagus Epithelium: An In Vitro Study*. Journal of the National Cancer Institute, 2002. **94**(6): p. 422-429.
53. Harris, R.E., et al., *Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review)*. Oncology reports, 2005. **13**(4): p. 559-584.
54. Wang, D. and R.N. DuBois, *Prostaglandins and cancer*. Gut, 2006. **55**(1): p. 115-122.
55. Wang, D. and R.N. DuBois, *The Role of COX-2 in Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer*. Oncogene, 2010. **29**(6): p. 781-788.
56. Wang, D. and R.N. DuBois, *Eicosanoids and cancer*. Nature reviews. Cancer, 2010. **10**(3): p. 181-193.
57. Choy, H. and L. Milas, *Enhancing Radiotherapy With Cyclooxygenase-2 Enzyme Inhibitors: A Rational Advance?* Journal of the National Cancer Institute, 2003. **95**(19): p. 1440-1452.
58. Elwood, P.C., et al., *Aspirin, salicylates, and cancer*. The Lancet, 2009. **373**(9671): p. 1301-1309.
59. Gasic, G., T. Gasic, and S. Murphy, *Anti-Metastatic Effect Of Aspirin*. The Lancet, 1972. **300**(7783): p. 932-933.
60. Kolenich, J., E. Mansour, and A. Flynn, *Haematological effects of aspirin*. The Lancet, 1972. **300**(7779): p. 714.
61. Moody, T.W., et al., *Dithiolethione modified valproate and diclofenac increase E-cadherin expression and decrease proliferation of non-small cell lung cancer cells*. Lung Cancer, 2010. **68**(2): p. 154-160.
62. Johnsen, J.I., et al., *Cyclooxygenase-2 Is Expressed in Neuroblastoma, and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Apoptosis and Inhibit Tumor Growth In vivo*. Cancer Research, 2004. **64**(20): p. 7210-7215.
63. Zelenay, S., et al., *Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity*. Cell, 2015. **162**(6): p. 1257-1270.
64. Attiga, F.A., et al., *Inhibitors of Prostaglandin Synthesis Inhibit Human Prostate Tumor Cell Invasiveness and Reduce the Release of Matrix Metalloproteinases*. Cancer Research, 2000. **60**(16): p. 4629-4637.
65. Jia, X.-Q., et al., *Effect of NS-398 on colon cancer cells*. World Journal of Gastroenterology : WJG, 2005. **11**(3): p. 353-356.
66. Masferrer, J.L., et al., *Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitors*. Cancer Research, 2000. **60**(5): p. 1306-1311.
67. Grösch, S., et al., *COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib*. The FASEB Journal, 2001. **15**(14): p. 2742-2744.
68. Hanif, R., et al., *Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway*. Biochemical Pharmacology, 1996. **52**(2): p. 237-245.
69. Palayoor, S.T., P.J. Tofilon, and C.N. Coleman, *Ibuprofen-mediated Reduction of Hypoxia-inducible Factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in Prostate Cancer Cells*. Clinical Cancer Research, 2003. **9**(8): p. 3150-3157.
70. Zhong, H., M. Willard, and J. Simons, *NS398 reduces hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-1 activity: Multiple-level effects involving cyclooxygenase-2 dependent*

- and independent mechanisms*. International Journal of Cancer, 2004. **112**(4): p. 585-595.
71. Halestrap, A.P. and M.C. Wilson, *The monocarboxylate transporter family - Role and regulation*. IUBMB Life, 2012. **64**(2): p. 109-119.
  72. Tamai, I., et al., *Participation of a Proton-Cotransporter, MCT1, in the Intestinal Transport of Monocarboxylic Acids*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **214**(2): p. 482-489.
  73. Emoto, A., et al., *H<sup>+</sup>-linked transport of salicylic acid, an NSAID, in the human trophoblast cell line BeWo*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2002. **282**(5): p. C1064-C1075.
  74. Mathupala, S.P., P. Parajuli, and A.E. Sloan, *Silencing of Monocarboxylate Transporters via Small Interfering Ribonucleic Acid Inhibits Glycolysis and Induces Cell Death in Malignant Glioma: An in Vitro Study*. Neurosurgery, 2004. **55**(6): p. 1410-1419.
  75. <http://www.drugs.com/dosage/ibuprofen.html>.
  76. <http://www.drugs.com/dosage/aspirin.html>.
  77. <https://www.drugs.com/dosage/diflunisal.html>.
  78. <http://www.drugs.com/pro/diclofenac.html>.
  79. <https://www.drugs.com/dosage/celecoxib.html>.
  80. Elwood, P.C., et al., *Aspirin in the treatment of cancer: reductions in metastatic spread and in mortality: a systematic review and meta-analyses of published studies*. PloS one, 2016. **11**(4): p. e0152402.
  81. Pantziarka, P., et al., *Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) - diclofenac as an anti-cancer agent*. ecancermedicalscience, 2016. **10**: p. 610.
  82. Leidgens, V., et al., *Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms*. PLOS ONE, 2015. **10**(10): p. e0140613.
  83. Shirakawa, K., et al., *Salicylate, diflunisal and their metabolites inhibit CBP/p300 and exhibit anticancer activity*. eLife, 2016. **5**: p. e11156.
  84. Liao, X., et al., *Aspirin Use, Tumor PIK3CA Mutation, and Colorectal-Cancer Survival*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(17): p. 1596-1606.
  85. Chirasani, S.R., et al., *Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model*. International Journal of Cancer, 2013. **132**(4): p. 843-853.
  86. Mayorek, N., N. Naftali-Shani, and M. Grunewald, *Diclofenac Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer by Modulation of VEGF Levels and Arginase Activity*. PLOS ONE, 2010. **5**(9): p. e12715.
  87. Doherty, J.R. and J.L. Cleveland, *Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(9): p. 3685-3692.
  88. Arora, R., et al., *Inhibition of the Warburg effect with a natural compound reveals a novel measurement for determining the metastatic potential of breast cancers*. Oncotarget, 2015. **6**(2): p. 662-678.
  89. Koukourakis, M.I., et al., *Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway - a report of the Tumour Angiogenesis Research Group*. Journal of clinical oncology, 2006. **24**(26): p. 4301-4308.
  90. Viale, A., et al., *Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function*. Nature, 2014. **514**(7524): p. 628-632.
  91. McClelland, M.L., et al., *Lactate Dehydrogenase B Is Required for the Growth of KRAS-Dependent Lung Adenocarcinomas*. Clinical Cancer Research, 2013. **19**(4): p. 773-784.
  92. Sun, W., et al., *Lactate Dehydrogenase B Is Associated with the Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Oral Squamous Cell Carcinoma*. PLoS ONE, 2015. **10**(5): p. e0125976.

93. Sasaki, S., et al., *Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line*. Drug Metab Pharmacokinet, 2016. **31**(3): p. 218-23.
94. Forget, P., et al., *Intraoperative use of ketorolac or diclofenac is associated with improved disease-free survival and overall survival in conservative breast cancer surgery*. British Journal of Anaesthesia, 2014. **113**(suppl 1): p. i82-i87.
95. Forget, P., et al., *Neutrophil:Lymphocyte Ratio and Intraoperative Use of Ketorolac or Diclofenac are Prognostic Factors in Different Cohorts of Patients Undergoing Breast, Lung, and Kidney Cancer Surgery*. Annals of Surgical Oncology, 2013. **20**(3): p. 650-660.

# Danksagung

*Slow and steady wins the race...*

Die Fertigstellung dieser Doktorarbeit hing die letzten Jahre wie ein Damoklesschwert über mir - und dass sie nun ENDLICH fertig ist, verdanke ich vor allem auch den vielen lieben Menschen, die ich hier noch namentlich aufführen möchte.

Allen voran gilt mein riesengroßer Dank Dir, liebe **Marina** - ohne Deine Unterstützung und Deine Engelsgeduld wäre ich heute nicht an diesem Punkt! Jeder Doktorand kann sich glücklich schätzen, so eine Betreuung zu bekommen. Auch wenn Du selber immer genug um die Ohren hattest, fandst Du immer eine Minute Zeit und standst mir mit Rat und Tat zur Seite. Durch Deine Begeisterung und Deine positive Art machte die Arbeit im Labor auch einem „Nicht-Forscher“ wie mir sehr viel Spaß.

Vielen Dank weiterhin an die Abteilungschefs der Hämatologie/Onkologie, **Herrn Prof. Dr. Reinhard Andreesen** und seinen Nachfolger **Herrn Prof. Dr. Wolfgang Herr**, für das Ermöglichen dieser Doktorarbeit.

Dann möchte ich mich ganz herzlich bei all den lieben Menschen im Labor bedanken, durch die der H1 zu einem zweiten Zuhause während des Studiums wurde. Ich bedanke mich bei **Kaste** und **Katrin P.** für die unendliche Geduld - auch nach der 100. Frage - und Unterstützung bei meiner Doktorarbeit und all meinen Versuchen. Bei der lieben **Gabi**, die mit mir blutigem Forschungs-Anfänger in ihrer seelenruhigen Art Stunden an der Sterilbank zugebracht hat, und ohne die meine Experimente sicher in die Hose gegangen wären. Ich bedanke mich bei **Eva** für ihre wissenschaftliche Unterstützung. Bei **Julia W.**, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mich auch noch nach mehreren Jahren beim Formatieren und Durchhalten unterstützt hat. Bei **Bernadette**, durch die ich überhaupt in dieser tollen Arbeitsgruppe gelandet bin. Und bei **Alice, Chris, Eddy, Dagmar, Claudia, Hang, Carol, Sandra, Julia, Sabine, Iren, etc.** für die helfenden Hände sowie die vielen schönen gemeinsamen Stunden und Kaffeepausen - dank Euch habe ich mich im Labor so richtig wohl gefühlt.

Mein großer Dank gilt natürlich **meinen Eltern**, die mich seit eh und je bei allem unterstützen, was ich mache - die mir nie einen Stein in den Weg gelegt haben, egal wohin mich mein Weg mal wieder geführt hat, auch wenn sie damit ihre einzige Tochter ins Ausland ziehen lassen mussten. Sie haben immer ein offenes Ohr und glauben an mich, auch wenn ich einmal den Kopf in den Sand stecke. Bessere Eltern kann man sich nicht wünschen.

Ich bedanke mich auch bei meinen Freundinnen aus Nah und Fern, vor allem auch bei **Birgit** und **Theresa**, die mich seit 25 Jahren begleiten und immer für mich da sind.

Und zu guter Letzt möchte ich Dir danken, mein lieber **Luc** - Du bist zwar erst auf den letzten Metern dieser Doktorarbeit dazu gestoßen, aber ohne Deine Hilfe und Geduld hätte ich wahrscheinlich so kurz vor dem Ziel noch die Flinte ins Korn geworfen. Danke, dass Du mich immer wieder gepusht hast, vor allem, wenn ich mal wieder mit dem Schreiben und meinem Laptop am Verzweifeln war. Du siehst in mir den Menschen, der ich sein kann und hältst immer zu mir. Ich liebe Dich.







